

SÉRIE A : N° 91

N° D'ORDRE : 111

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

E. PICHON-YENDEUIL

1^{re} THÈSE. — **Contribution à l'étude des Amino-Acides du Lait de vache.**

2^e THÈSE. — **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 24 Février 1921 devant la Commission d'examen.



MM. G. BERTRAND, *Président.*

LEDUC
JAVILLIER } *Examineurs.*

PARIS
EDITIONS MÉDICALES

7, RUE DE VALOIS, 7

1921

ERRATA

Liste des professeurs: lire appliquée au lieu de appliquée.

Page 8, 8^e ligne, lire expériences au lieu de expérience.

Page 12, 16^e ligne, lire CO² au lieu de co².

Page 31, 11^e ligne, lire BACL² au lieu de Bacl².

Page 33, 9^e ligne, lire On agite au lieu de On ajoute.

Page 34, 15^e ligne, lire température de 35° au lieu de 75°.

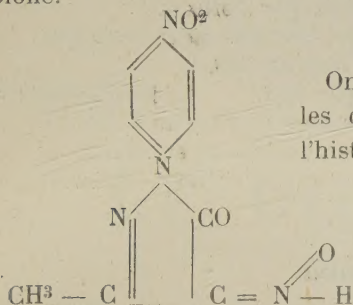
Page 34, 20^e ligne, lire HCL au lieu de Hcl.

Page 41, note, lire Zeit au lieu de Zur.

Page 48, 24^e ligne, lire alcool au lieu de alcool.

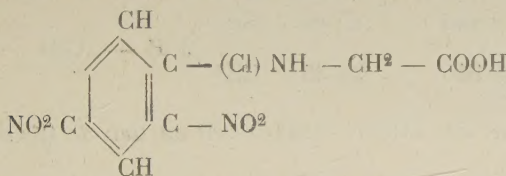
Page 50, remplacer la formule Dérivés du Nitrophenyl et la suivante par celles ci-dessous.

δ Dérivés du Nitrophenyl. 3 methyl — 4 isonitro, 5 pyrazolone.



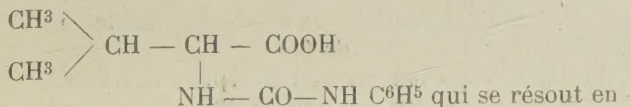
On a obtenu avec ce corps les dérivés de l'arginine, de l'histidine et de l'ornithine.

5° Dérivés du dinitrochlorobenzol.



Page 50, supprimer une liaison du dérivé pyrazolique.

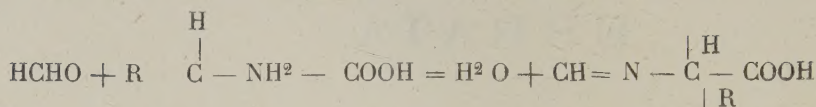
Page 51, 3^e ligne, remplacer la formule par celle ci-dessous.



Page 52, lire acide glutamique au lieu d'aspartique.

Page 54, note 1, lire (1) (BRUCKE, Wiener Akad., 1881, BODSYNSKI et ZOJA. Zeit phys.

Page 57, formule à remplacer par celle ci-dessous.



Page 57, avant dernière ligne, lire inhérents au lieu de inhérent.

Page 66 note, lire page 95 au lieu de page 65.

Page 67, 9^e ligne, lire laissent voir au lieu de laisse voir.

Page 69, 21^e ligne, lire : A ce magma, au lieu de magmas.

Page 69, note, lire Wiener au lieu de Wieuer.

Page 73, 11^e ligne, lire : a une valeur, au lieu de valent.

Page 90, note 2, lire HUGOUNENQ au lieu de HUGOUNEUQ.

Page 92, 22^e ligne, lire Tanret au lieu de Tauret.

Page 93, 15^e ligne, lire hydrocarbonés au lieu de Hydrocarbones.

Page 94, 18^e ligne, lire neutralisé au lieu de neuralisé.

Page 96, 2^e ligne, lire N par Kjeldahl au lieu de N par kjeldall.

Page 100, 21^e ligne, lire révélé au lieu de révélée.

Page 103, note, lire page 109 au lieu de page.

Page 111, 5^e ligne, lire molécule au lieu de mollécule.

Page 112, 1^{re} formule, dernière ligne, lire NH² au lieu de NH.

Page 115, 1^{re} formule, lire CH au lieu de CH².

Page 118, 23^e ligne, lire Hydrolyse par HCL Hydrolyse SO⁴ H².

Page 127, 12^e ligne, lire l'eau froide au lieu de l'ean froide.

Page 130, 25^e ligne, lire dans l'alcool, au lieu de en alcool.

Page 141, 5^e ligne, remplacer la formule par celle ci-dessous.

Ces chiffres correspondent à :

	moyenne théoriquement					
C	54.99	55.16	55.075	54.96		pour
H	9.93	9.94	9.935	9.92	C ⁶ H ¹³ N ⁰²	
N	10.64	10.65	10.645	10.69	CH ³	$\left. \begin{array}{l} \text{CH} - \text{CH}^2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \text{NH}^2 \end{array} \right\}$
O	24.44	24.25	24.345	24.43	CH ³	

Page 142, 19^e ligne, lire COOH — CH² — CH² au lieu de COOH — CH — CH.

Page 145, note 1, lire Acides Aminés, au lieu de Acides Aminé.

Page 149, dernière formule lire H²O au lieu de H²⁰.

Page 149, note 2, lire Habilitations au lieu de Habitations.

Page 150, note 1, lire Métabolisme au lieu de Métalioléine.

Page 151, note 6, lire Jl au lieu de Cl.

Page 153, 13^e ligne, supprimer le mot phosphotungstique.

Page 153, 22^e ligne, lire = H²O au lieu de H2O.

Page 155, note, lire deut. au lieu de dact.

Page 157, avant dernière ligne, lire permis, dans le résidu, au lieu de rendu.

THÈSE
POUR
LE DOCTORAT

MM.

Doyen MOLLIARD, *Professeur*, Physiologie végétale.
Doyen honoraire . . . P. APPELL.

<i>Professeurs honoraires.</i>	P. PUISEUX.
	VÉLAIN.
	BOUSSINESQ.
	BOUTY.

LIPPmann.	Physique.
E. PICARD.	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
Gaston BONNIER.	Botanique.
KœNIGS.	Mécanique physique et expérimentale.
GOURSAT.	Calcul différentiel et calcul intégral.
HALLER.	Chimie organique.
JOANNIS.	Chimie (Enseignement P. C. N.)
JANET.	Electrotechnique générale.
WALLERANT.	Minéralogie.
ANDOYER.	Astronomie.
PAINLEVÉ.	Mécanique analytique et mécanique céleste
HAUG.	Géologie.
H. LE CHATELIER.	Chimie générale.
Gabriel BERTRAND.	Chimie biologique.
M ^{me} P. CURIE.	Physique générale.
CAULLERY.	Zoologie (Evolution des êtres organisés)
C. CHABRIÉ.	Chimie appliquée.
G. URBAIN.	Chimie minérale.
Émile BOREL.	Calculs des probabilités et Physique mathématique.

Professeurs

MARCHIS	Aviation.
Jean PERRIN	Chimie physique.
G. PRUVOT	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
MATRUCHOT	Botanique.
ABRAHAM	Physique.
CARTAN	Mécanique rationnelle.
Cl. GUICHARD	Géométrie supérieure.
LEBESQUE	Application de l'analyse à la Géométrie
LAPICQUE	Physiologie.
GENTIL	Géographie physique.
VESSIOT	Calcul différentiel et calcul intégral.
COTTON	Physique théorique et Physique céleste
DRACH	Mathématiques générales.
N.	Histologie.
N.	Zoologie, anatomie, physiologie comparées
N.	Physique.

Professeurs adjoints.

LEDUC	Physique.
HÉROUARD	Zoologie.
LÉON BERTRAND	Géologie.
RÉMY PERRIER	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
LESPIAU	Chimie.
SAGNAC	Physique théorique et physique céleste.
PEREZ	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
RABAUD	Biologie générale.
PORTIER	Physiologie.
BLAISE	Chimie organique.
PÉCHARD	Chimie (Enseignement P. C. N.).

Secrétaire Daniel TOMBECK

SÉRIE A : N° 91

N° D'ORDRE : 111

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

E. PICHON-VENDEUIL

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude des Amino-Acides du Lait de vache.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le Février 1921 devant la Commission d'examen.

MM. G. BERTRAND, *Président.*

LEDUC
JAVILLIER

Examineurs.

PARIS
EDITIONS MÉDICALES
7, RUE DE VALOIS, 7

1921

PLAN DE L'ÉTUDE

CHAPITRE I

Étude
de l'état
de la question
et examen
des méthodes
employées

CONTRIBUTION

- A). État de la question. — Sources peu nombreuses. — Citations de quelques corps azotés se trouvant dans la portion soluble isolée des protéines du lait, parmi lesquels la Leucine, la Créatinine, la Xanthine et l'Hypoxanthine, sans méthodes de dosage. L'Urée et l'Ammoniaque sont dosés dans le lait. On trouve aussi de la Guanine et de l'Adénine.
- B). Commeille, Hoppe-Seyler, Kœnig. Méthodes de dosage de l'azote que l'on suppose appartenir à plusieurs corps azotés dans le lait, parmi lesquels se trouveraient les Amino-Acides. — I. Henseval. II. Monvoisin. III. Revue générale des laits.
- C). Méthodes de dosage des Amino-Acides dans les liquides physiologiques (sang et urine). — I. Abderhalden. II. Ammam. III. Narding et Léan. IV. Taylor et Hulton. V. De Graaff et Vander Zaude. VI. Karl Neuberg. VII. Donald et Van Slyke. VIII. Costantino. IX. Henriques et Sorensen. X. Embden et Reese. XI. Ethérisation des Amino-Acides par Fischer. XII. Procédé de Siegfried. XIV. Procédé de Dakin. XV. Sels de cuivre de zinc, picrate. Procédé de Chelle.

A

CHAPITRE II

L'ÉTUDE

Étude
expérimentale
de la valeur
de
quelques réactifs
précipitants
et de
quelques méthodes

DES

AMINO - ACIDES

DU

LAIT DE VACHE

CHAPITRE III

Étude
de la méthode
adoptée
et des
Amino-Acides
du lait

- I. Réactions colorées des protéines. — Définition de l'Azote non protéique d'un liquide physiologique isolé par un réactif.
- II. Raisons pour lesquelles on va étudier une série de réactifs précipitants. — I. Almen. II. Brucke. III. Mayer. IV. Denigès. V. Tanret. VI. Trichloracétique. VII. Alcool acétique à 65°. VIII. Phosphotungstique. IX. Silicolumstique.
- RÉSULTATS : Mise en parallèle de ces divers réactifs pour les réactions générales, la valeur de précipitation, la valeur azotée totale. — L'alcool acétique à 65° se montre le meilleur. —
- III. Rôle hydrolysant, à froid de l'acide sulfurique sur le lait. — Mauvaise méthode. — Perte d'Amino-Acides.
- IV. Action du Formaldéhyde sur le lait. — Echec de ce réactif sur les amino-Acides du lait. — Étude des méthodes de dosage des matières protéiques du lait par ce réactif.
- I. La méthode de précipitation des Amino-Acides en milieu alcalin par l'acétate de mercure, de Johannes Kerb et Carl Neuberg, est adoptée, par sa commodité et sa facilité.
- On sépare les protéines par alcool à 65° acidifié à 1/000 ; Azote total beaucoup plus considérable qu'avec les autres réactifs. Pas d'altération des protéines du lait.
- Sept laits traités par cette méthode fournissent en moyenne un poids de 1,017 d'Amino-Acides par litre. Seul, le Glycocolle est identifié avec ses dérivés : picrique, zincique, cuivrique, amide benzoïque, chlorhydrate d'éther. — Poids moléculaire ; Composition centésimale.
- II. 2° SERIE D'EXPERIENCES (méthode de l'auteur pour la séparation des Amino-Acides). 20 litres de lait fournissent 20,020 d'Amino-Acides, c'est-à-dire 1,01 par litre. De cet ensemble, on retire : 13,01 de Glycocolle, 1,80 de Tyrosine, 1,836 de Leucine, 0,39 d'acide aspartique et 1,07 d'acide glutamique.
- Réactions générales. Poids moléculaires. Combustions.
- III. Une expérience effectuée par la même méthode, après neutralisation, montre que les Amino-Acides du lait ne proviennent pas de l'hydrolyse d'un polypéptide.

CHAPITRE IV

De quelques considérations biologiques et conclusions.

Contribution à l'Étude des Amino-Acides du Lait de Vache

INTRODUCTION

Une étude méthodique des Amino-Acides du lait n'a jamais été publiée. L'examen de la volumineuse bibliographie inhérente aux nombreux travaux effectués sur les Amino-Acides depuis une vingtaine d'années montre que les documents sont très rares à ce sujet (1). Certains auteurs ont admis que l'Azote non protéique du lait pouvait revêtir la forme d'urée, de Créatine, de Créatinine, de Sarcine et d'Amino-Acides. Mais, parmi tous ces corps, il n'y a que l'urée qui ait fait l'objet d'un dosage précis (2).

La présence probable de Leucine a été signalée (3), mais on n'a jamais établi ce fait par un ensemble d'expériences concluantes.

M. Bouin, professeur à la Faculté des Sciences de Nancy et directeur de l'école de laiterie, nous avait signalé l'imprécision qui régnait au sujet de la valeur et de la qualité de ce qu'on dénommait dans le lait Azote non protéique. Il nous avait indiqué que les Amino-Acides devaient avoir un rôle prépondérant dans la por-

(1) (Etat de la question), chapitre I, page 5.

(2) Loc. cit., page 7.

(3) Loc. cit., page 7.

tion soluble isolée des matières protéiques, et nous avait engagé à essayer de préciser cette question.

Nous le remercions ici de la bienveillance et de la confiance qu'il nous a témoignées.

Nous remercions M. le Professeur Gabriel Bertrand de sa bienveillance; d'avoir bien voulu accepter la présidence de notre thèse, et de nous avoir indiqué une des expériences les plus importantes de notre travail.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements à tous ceux qui par leurs conseils éclairés ont contribué à mener à bien cette étude : M. Albert Morel, professeur à la Faculté de Médecine de Lyon; M. Favrel, professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy; M. Tiffeneau, professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Paris; M. Delaunay, professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Bordeaux; M. Mathieu, préparateur à la Sorbonne; M. Galtier, ex-chef de travaux à la Faculté des Sciences de Bordeaux; MM. Masson et Weil, directeurs de laboratoire.

CHAPITRE PREMIER

État de la Question et examen des Méthodes employées

En parcourant la littérature scientifique, on est tout d'abord frappé du nombre considérable de travaux effectués sur les Amino-Acides. Ces corps azotés, qui sont à la base de l'édifice des matières protéiques, ont fait l'objet, depuis une vingtaine d'années, de recherches qui ont été couronnées de succès. Les chimistes, représentés à ce point de vue aussi brillamment en France qu'en Allemagne, rendirent de signalés services aux physiologistes et leur permirent d'expliquer facilement différentes phases du métabolisme de l'Azote dans l'organisme.

Et tandis que le Glycocolle était trouvé dans le sang de bœuf (1) par Bingel, d'après la méthode de Fischer Bergell (2) à la dose de 0,21 sous la forme de B (Naphthalène) sulfo-Glycocolle, tandis qu'on avait caractérisé également le Glycocolle, le Tryptophane, la Lysine, l'Arginine, l'Histidine, la Proline, la Leucine, la Va-

(1) A. BINGEL. *Ueber Gewinnung von Glykokoll aus normalen blut*. *Zeit phys. chem.* T. LVII 382.358.

(2) Loc. cit., page 31.

line, l'Acide glutamique dans le sang humain (1) et que les urines présentaient également une Amino-Acidurie normale, (2), (3), (4), (5) avec la présence de Glycocolle, on n'avait pas cherché à savoir par quels éléments azotés était constitué l'Azote soluble ou l'Azote non protéique du liquide physiologique le plus étudié chimiquement : le lait de vache.

Les livres les mieux documentés pour la bibliographie des Amino-Acides, le Biochemische Hand lexicon 1913 ne signale pas que la Leucine ait été trouvée dans le lait, et parmi les traités de biologie récents (édition de 1919), celui de Lambling qui traite avec autorité et beaucoup de netteté le rôle biologique des Amino-Acides dans l'organisme humain et dans les différents liquides, ne mentionne rien au sujet du lait.

Nous avons parcouru avec attention cette bibliographie intéressante et voici ce que nous avons pu trouver :

La plupart des détails intéressant et touchant l'Azote non protéique du lait ont leur bibliographie dans Koenig (5).

Koenig (6) signale que Lefort (7) et Morin (8) ont trouvé dans les laits jusqu'à 0,008 % d'urée. Le même

(1) ABDERHALDEN. *Zeit phys. chem.* T. LXXXVIII, 6, p. 478.

(2) EMDEN et REESE. *Hofmeister-Beit.* 7, 411, 1905.

(3) ABDERHALDEN et SCHITTENHELM. *Zeit phys. chem.* 47, 339, 1906.

(4) WOLGENUTH et C. NEUBERG. *Med. Klin.*, 1906.

(5) J. Koenig *die Menschlichen Nahrungs und Genussmittel.* (éditeur Springer, à Berlin).

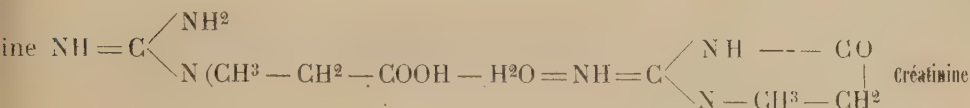
(6) *Zeit für die untersuchung der Nahrungs und Genussmittel.* 1914. T. 27.759 à 76.

(7) Tome III, 1^{re} partie, 1914, p. 187.

(8) *Archiv. der pathologischen. Anatomie und physiologie*, tome 17, p. 434.

l'auteur dit dans le même ouvrage que Schmidt Mülheim rend probable la présence d'Hypoxanthine et de Sarcine dans le lait (1).

Commeille dans le même opuscule (2) et Weyl tiennent pour probable la présence de Créatinine dans les laits (3).

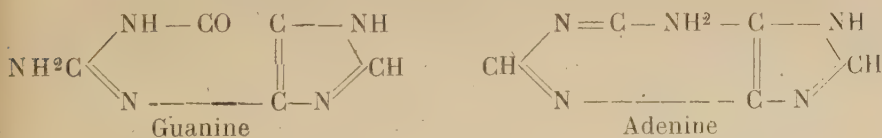


Hoppe-Seyler (4) est d'avis que la Leucine (caractérisée probablement au microscope) dans les laits est un produit de décomposition des protéines.

Kœnig signale enfin que le lait doit contenir en outre de la Xanthine et de l'Hypoxanthine (5).

Enfin de l'Adénine et de la Guanine, qui sont des bases xanthiques, auraient été trouvées dans le lait de vache par Vœglin (6).

En plus, Tillmanns Splittgerber et Riffart (9) donnent une moyenne de 3 à 4 milligrammes d'Ammoniaque par litre de lait.



(1) Tome II, page 587.

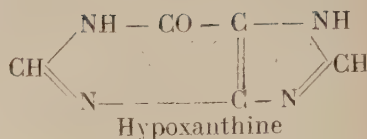
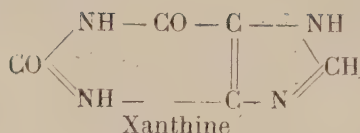
(2) LEFORT. *Jahresbericht der chemie*, 1866, page 747, et MORIN (J.) *Jahresbericht der chemie*, 1867, page 811.

(3) Tome II, p. 588.

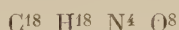
(4) *Jahresbericht der chemie*, 1868, page 828.

(5) *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1878, Tome II, p. 2476.

(6) *Journal of biol. chemistry*, 1918, p. 33, p. 145.



On a signalé également dans le lait parmi les corps azotés non protéiques, des corps appelés Nucléones et qui furent étudiés par Siegfried (1) et Wittmack (2). D'après ces auteurs ces corps seraient des composés complexes phosphorés et azotés, donnant à l'hydrolyse de l'acide orylique



qui lui-même hydrolysé se dédouble en acide paralactique, acide succinique et un corps identique à l'anti-peptone de Kühne. Pour obtenir ces corps Wittmack traite le lait de la façon suivante : Le lait est acidifié avec acide acétique et un courant de CO_2 pour précipiter la caséine et le filtrat est débarrassé d'albumine et de globuline à l'ébullition. Le filtrat est traité par le chlorure de calcium et l'ammoniaque pour précipiter les phosphates; après filtration nouvelle on traite par le perchlorure de fer à l'ébullition. On a une combinaison ferrugineuse de la Nucléone. Wittmack a trouvé 0,124 % de Nucléone dans certains laits.

Bien que ces Nucléones soient probablement précipitées par les réactifs précipitants des protéines du lait, l'Azote de ces corps ne paraît pas exactement situé ou dans les portions solubles ou dans les inso-

(1) SIEGFRIED-DUBOIS. *Arch.*, 1894, 401, et *Zeit phys. chem.*, XXI, 360 et XXVIII, 524.

(2) WITTMACK. *Zeit. phys. chem.*, XXI,

lubles des réactifs précipitants. On a pu voir, par la méthode de préparation de ces corps, qu'ils ne coagulent pas à l'ébullition et qu'ils sont laissés dans la portion soluble isolée des corps protéiques du lait. Il ne serait donc pas étonnant qu'une certaine quantité d'Azote fourni par leur passage dans la portion soluble isolée des protéines vienne de ces corps. C'est pour cette raison qu'il convient de les connaître.

Enfin, parmi les autres corps azotés non protéiques du lait on peut trouver, selon le mode d'alimentation de la vache, de l'Azote sous la forme d'un Senevol (Stœcklin) (1)



par ingestion de tourteaux de crucifères.

La Revue Générale des laits, sous la direction de Henseval, Weigmann et Jedoeist, publie une analyse critique d'un mémoire de Gustave Simon par M. Biourge, Professeur à l'Université de Louvain, au sujet des réactifs précipitants des protéines du lait. Le dosage polarimétrique du lactose dans les filtrats, est étudié à cette occasion ainsi que celui de l'azote. L'auteur admet dans ces filtrats, les peptones à l'état de traces indosables et une faible proportion de matières azotées non albuminoïdes. Il attribue les divergences d'opinion des auteurs à ce sujet à l'imperfection et à la grande variété des méthodes de dosage et de séparation des protéines. Il entreprend d'en discuter un certain nombre par des expériences comparatives. Il

(1) *Annales des Falsifications*, p. 321, 1908.

réfute la valeur des procédés gravimétriques tant parce que les précipités sont de composition inconstante qu'à cause des décompositions qu'ils peuvent subir pendant leur dessiccation à des températures d'étuve trop élevées. Il dose l'azote d'après Kjeldahl, dans les précipités et les filtrats. Les méthodes par : cyanures, nitrates, sels ammoniacaux, ou éléments azotés de quelque nature qu'ils soient, sont évidemment écartées. Les réactifs d'Almen, le phosphotungstique, l'acide trichloracétique, le sulfate de cuivre, l'alun, l'acide métaphosphorique de Denigès, l'Asaprol, sont étudiés. Les conclusions sont, que pour lui les méthodes de séparation des protéines dans le lait de vache sont actuellement peu sûres et rapides, mais le réactif d'Almen sépare bien les albuminoïdes totaux, l'alun de Schlossmann élimine bien la caséine. Quant aux extractifs azotés, ils sont dosés par la méthode de Kjeldahl, dans les filtrats du réactif d'Almen (Revue Générale des laits, 1910-1913).

Et maintenant si nous passons à l'examen des méthodes de dosage des Amino-Acides du lait, voici les renseignements découverts à ce sujet.

Monvoisin (journal de pharmacie et chimie, 1910, tome 22, page 23) fait une étude sur la composition des laits pathologiques dans les affections des mamelles de la vache et constate que l'azote non protéique augmente dans ces affections; voici le tableau qu'il en dresse :

Quantité par litre

	Laits normaux	Laits tuberculeux
Azote total	4,3 à 5,8	5,38 à 5,93
Azote de la caséine...	3,7 à 4,3	2,94 à 3,18
Azote albuminoïde....	0,95	1,916 à 2,44
Azote aminé	0,15 à 0,24	0,524 à 0,300

En centième de l'azote total

Azote de la caséine...	77 à 81	54,65 à 53,69
Azote albuminoïde ...	15 à 17	35,61 à 41,25
Azote aminé	2,5 à 4,7	9,74 à 5,06

L'Azote, du filtrat du réactif phosphotungstique agissant sur le lait, est considéré par l'auteur précité comme représentant l'Azote Acido-Aminé.

Le même dosage, avec le même procédé, se retrouve exposé dans la Revue Générale des laits.

On répartit les matières azotées en trois groupes : Caséine, matières albuminoïdes et substances aminées. L'azote total est déterminé par le procédé Kjeldahl sur 5 cm³ de lait, et le résultat rapporté au litre (1).

Pour la séparation de la caséine, on opère sur 50 cc. de lait étendu de 100 cc. d'eau distillée, on verse avec précaution de l'acide acétique à 1 % jusqu'à commencement de précipitation de la caséine; à partir de ce moment, on verse encore 5 cc. du même liquide acide et on fait passer ensuite CO² pendant une demi heure. On admet que ce traitement entraîne la caséine seule. Après avoir complété à 250 cc. avec eau distillée, on filtre pour séparer la caséine précipitée. Dans une partie aliquote du filtrat, par exemple 50 cc. correspondant

(1) *Revue générale des laits*. Vol. VIII, p. 705.

à 10 cc. de lait, on détermine l'azote par le procédé de Kjeldahl. On obtient un nombre $\bar{a}$ = azote des matières azotées autre que la caséine. L'azote de la caséine est représenté par B, on a $B = N \text{ total} - \bar{a}$; on $\times B$ par 6,39. Sur une portion de 100 cc. du filtrat privé de caséine correspondant à 20 cc. de lait on a effectué la séparation des albumines. Cette portion a été additionnée de 30 cc. de $\text{SO}_4 \text{H}_2$ au quart et de 20 cc. d'une solution à $1/10^e$ d'acide phosphotungstique. Après un repos de douze heures, on filtre pour éliminer les substances précipitées par le phosphotungstique. Sur 75 cc. du filtrat correspondant à 10 cc. de lait, on détermine l'azote par le procédé de Kjeldahl, soit une quantité C qui représente l'azote de l'Urée, de la Leucine, de la Créatine et des substances aminées. On multiplie C par le facteur 9,35, on a ainsi l'azote des substances azotées non protéiques. L'azote des matières précipitées par l'acide phosphotungstique (albumine et globuline) est donc représentée par ($d = a - c$) et le poids de ces substances est obtenu en multipliant d par 6,34. Le facteur 6,557 est multiplié par la quantité de N total trouvée pour avoir le poids total des matières azotées.

Ce procédé de dosage, indiquant parmi les substances azotées qu'on peut trouver dans le filtrat du réactif phosphotungstique, agissant sur le lait, des corps tels que l'Urée, la Leucine, la Créatine, la Créatinine, paraît avoir été inspiré par l'ouvrage de Kœnig qui signalait ces substances dès 1876.

Enfin nous croyons devoir signaler, à côté de ces données peu significatives que nous avons au sujet des Amino-Acides du lait, les méthodes les plus ré-

centes pour le dosage et l'isolement des Amino-Acides dans les liquides physiologiques. Parmi ces méthodes qui sont de plus en plus parfaites il en est de commodées et de précises, notamment celle de Carl Neuberg (1) où on précipite les Amino-Acides en milieu alcalin, avec l'acétate de mercure. Ce procédé a donné à l'auteur des corps d'une grande pureté, et on verra que comparativement au procédé de Fischer Bergell, qui a permis également l'isolement de corps très purs à l'état de combinaison (chlorure de B Naphthalène sulfo-Amino-Acide), il est beaucoup plus simple, quoique très long à l'adaptation au lait.

Ces différents procédés vont être passés en revue, et les conseils généraux qui émanent de leur étude formeront, en vue du procédé à adopter, un faisceau de détails utiles à connaître.

I. — Dosages d'acides aminés dans le sang (2)

Avant de procéder au dosage des acides aminés, il faut débarrasser le sang de son albumine et du plasma par une méthode qui exclue une décomposition de l'albumine. On verse un litre de sang dans 15 litres d'eau distillée bouillante, on tient en ébullition pendant 15 minutes et on ajoute goutte à goutte de l'acide acétique à 1 %, en remuant continuellement. On cesse quand la coagulation est complète; le liquide trouble devient spontanément limpide, après filtration il est également limpide et ne montre plus la réaction du

(1) *Loc. cit.*, page 16.

(2) ABDERHALDEN, *Zeitschrift für Physiolog Chemie* 88, 478.

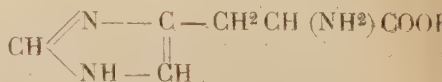
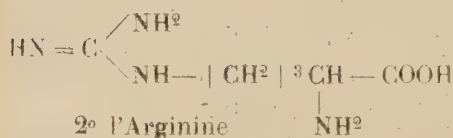
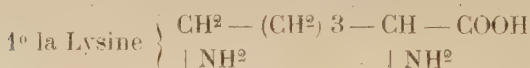
sang. En employant le plasma et sérum on obtient facilement un liquide exempt d'albumine et peptones. L'albumine coagulée est soumise à l'extraction par l'eau bouillante; à la fin du procédé on a 50 litres du liquide sur un litre de sang. On concentre au sec par le vide au bain-marie à 40; en employant la méthode des éthers-sels, on peut constater de petites quantités d'acides aminés.

D'autres méthodes pour précipiter ces acides aminés sont :

1° Le sulfate de mercure = précipitation du tryptophane;

2° L'acide glyoxalique ($\text{COOH} - \text{CHO}$) et l'eau bromurée, qui donne une réaction qualitative positive;

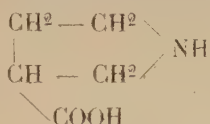
3° L'acide phosphotungstique précipite acides aminés basiques. La dernière précipitation se fait très lentement, le précipité est scindé par $\text{BA} (\text{OH})^2$ et l'on obtient les acides aminés suivants :



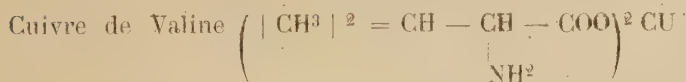
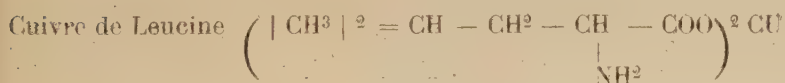
3° l'Histidine

4° Précipitation des acides aminés par l'acétate de mercure. On ajoute au liquide séparé de l'albumine par coagulation, une solution saturée de carbonate de sodium jusqu'à réaction alcaline. Ensuite on ajoute une solution d'acétate de mercure saturée à froid jusqu'à une précipitation blanche grisâtre. On ajoute de nouveau de la solution de carbonate de sodium afin de

maintenir la réaction alcaline; à la fin on verse un excès d'acétate de mercure. Le précipité est filtré immédiatement à la trompe et traité par l'acide sulfhydrique. Après filtration du sulfure de mercure, le liquide est concentré au sec par le vide au bain-marie à 40°. Le résidu est extrait avec de l'alcool absolu; filtration à chaud et évaporation à sec par le vide au bain-marie. Il a l'odeur de l'acide pyrrolidine carbonique.



Pour l'identification, on prépare le sel de cuivre (dissolution dans l'alcool absolu). La combustion du sel à l'odeur de la pyrrolidine et le point de fusion de l'acide pyrrolidine carbonique. Les acides aminés non solubles dans l'alcool sont chauffés avec de l'oxyde de cuivre et donnent les combinaisons avec le cuivre tel que :

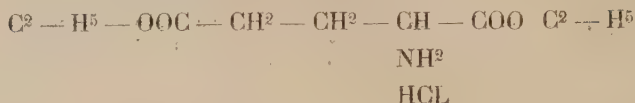


Dans les eaux mères on peut identifier l'alanine, le glycocolle, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

En employant la méthode des éthers sels on obtient le dérivé du glycocolle :



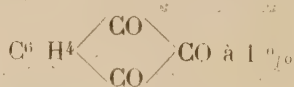
et le dérivé de l'acide glutamique :



Pour éliminer l'albumine du sang on peut également employer la dialyse. Le boyau de la vessie dialyseur est à vérifier avant l'emploi. Par ce procédé on a trouvé l'acide pyrrolidine, carbonique, la leucine, la valine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, le glycocolle; l'arginine, la lysine et l'histidine précipitées par l'acide phosphotungstique. On n'a pas trouvé plus de 0.4 gr. purifiés de chaque acide aminé.

II. — Dosage des polypeptides et des acides aminés dans le sang. (1)

La méthode est colorimétrique et se base sur la réaction de la ninhydrine. Pour éliminer l'albumine du sang on soumet ce dernier à la dialyse. 1 cc. de sérum frais centrifugé auquel on a ajouté quelques gouttes de toluène, est dialysé pendant 16 heures à une température de 37° dans dialyseur vérifié contre 10 cc. d'eau stérilisée saturée de toluène. 5 cc. du liquide dialysé sont mélangés avec 0, 2 cc. d'une solution de ninhydrine (hydrate de tricéthohydrindène).



On chauffe au bain-marie pendant 20 minutes, on laisse

(1) J. AMMAM. *Revue médicale Suisse Romande. Apotheker Ztg* 54, 302.

refroidir et compare dans un chromomètre la couleur obtenue à une solution type qu'on prépare de la manière suivante :

On hydrolyse de la caséine par $\text{SO}^4 \text{H}^2$ à 25 %. La solution doit contenir 10 milligr. de N dans 100 cc. Elle est mélangée avec 4 cc. d'eau saturée de toluène et avec 0,2 cc. d'une solution de ninhydrine. Comme solution type, peuvent également servir un mélange de bleu de méthylène, de violet de méthyl et de brun d'aniline.

La réaction de la Ninhydrine. (1)

Les bases organiques du type :



dont un radical est négatif donnent la réaction de la ninhydrine. D'autres bases qui cèdent facilement NH^2 ou qui sont facilement oxydables donnent également cette réaction. En présence de pyridine, les plus simples amines de la série grasse donnent la plus forte réaction. La couleur bleue de la réaction n'est donc pas absolument caractéristique de la présence d'acides aminés. Ces derniers doivent être éliminés avant de procéder à la réaction de la ninhydrine. Les dérivés des alcools, les aldéhydes primaires et secondaires donnent une réaction colorée avec la ninhydrine (glycérine, glycol éthylénique, aldéhyde glycérique, acétone, tous les sucres contenant CHO et CO).

(1) *Journal of biolog. chem.*, 25, 337, 50.

III. -- Méthode colorimétrique pour doser l'azote des acides aminés. (1)

La méthode se base sur la formation d'une couleur bleue résultant de l'action du tricétohydrindène sur les acides aminés qui contiennent le groupement $R-CH(NH^2)COOH$. La couleur bleue est :



1 cc. d'une solution qui ne doit pas renfermer plus de 0,05 milligr. d'azote alpha animé dont la réaction est neutre à la phénol-phtaléine est mélangé avec 1 cc. de pyridine à 10 % et 1 cc. d'une solution de tricétohydrindène à 2 %. Chauffer au bain-marie pendant 20 minutes, refroidir, remplir à 100 cc. et comparer à une couleur type dans le colorimètre de Duboscq.

La couleur type est préparée en dissolvant 0,3178 gr. d'alanine dans 1 litre d'eau. La solution contient 0,05 milligr. de N par cc., 1 cc. de cette solution est chauffé au bain-marie pendant 20 minutes avec 0,5 de pyrimi-



dine à 10 % et 1 cc. de tricétohydrindène à 1 %. Après refroidissement on remplit à 100 cc. avec de l'eau.

La couleur bleue est en proportion avec la quantité de N (quantité de 0,05 à 0,005 milligr. dans 1 cc. du liquide):

(1) NARDING et LEAN. *Jahr., For. der Tierchem.*, 43, 43,

Denigès a constaté que si on ajoute au liquide devenu bleu du CHCl_3 on obtient une teinte orangée. Ce serait un produit de déshydratation; le CHCl_3 évaporé et le résidu repris par eau et dissous donne la teinte bleue de nouveau. (Ann. falsification., 1912).

IV. — Dosage de l'Azote d'origine non protéique et du Glucose dans le sang des doigts. (1).

On ajoute 0,2 à 0,5 gr. de sang (4 à 8 gouttes) à un mélange d'éther alcool (10 cc.), après une demi-heure on filtre dans un récipient de Kjeldahl à 25 cc., on ajoute un peu de $\text{S O}_4 \text{ KH}$, on chasse l'alcool et l'éther en chauffant, on ajoute 1 cc. de $\text{SO}_4 \text{ H}_2$, on chauffe jusqu'à la décoloration du liquide, on verse dans un récipient de 100 cc. neutralisé avec environ 3 cc. de NaOH à 30 %, ajoute 5 cc. d'une solution de Nessler-Winkler, complète le volume à 100 cc. et compare la couleur dans un colorimètre de Duboscq. qui a comme couleur type une solution de sulfate d'ammoniaque qui contient 0,2 milligr. de N.

Le glucose est dosé par la méthode de Bang.

V. — L'ammoniaque et les Acides aminés dans l'urine. (2)

10 cc. d'urine (qui ne montre pas la réaction de l'albumine) sont mélangés dans un récipient rond de 200 cc. avec 1/2 gr. de $\text{CO}_3 \text{ Na}_2$ et 30 cc. d'alcool à 96 %.

(1) Alonso E. TAYLOR et Florence HULTON. *Journ. of biol. chem.*, 12, 63, 69.

(2) W.-C. de GRAFF et J.-E. VAN DER ZANDE. *Pharm. Weekblad* 1916, 1378, 82.

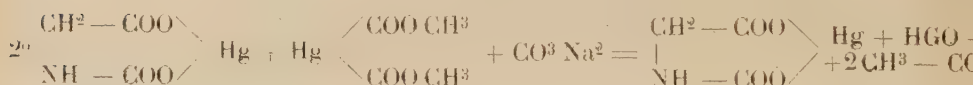
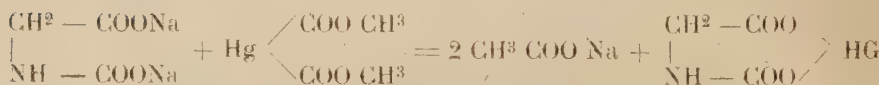
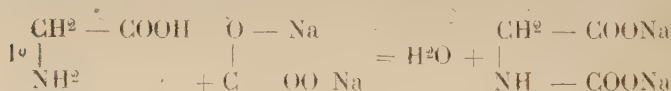
Distillation par réfrigérant de Liebig. On recueille 30 cc. du distillat dans un récipient contenant 10 cc. d'acide N/10. Chaque cc. de l'acide N/10 correspond à 0,001 milligr. 4 de N.

Pour doser l'acide aminé 10 cc. d'urine sont traités avec 10 cc. de formol et titrés avec Na OH N/10.

Nombre de cc. de formol, moins nombre de cc. d'azote ammoniacal = quantité d'azote des acides aminés.

VI. — Sur un moyen de précipitation des Amino-Acides. (1)

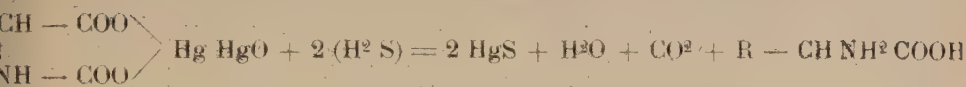
La précipitation des Amino-Acides est possible si elle a lieu dans une solution alcaline de carbonate de sodium très faible au moyen de l'acétate de mercure. Il s'agit sans doute de la réaction suivante, en prenant pour exemple une solution de glycocolle.



En ajoutant de l'alcool, la précipitation est encore plus complète, le carbonate de sodium ne peut pas être remplacé par de la soude caustique puisque cette dernière produirait une précipitation d'oxyde de mercure.

(1) Carl NEUBERG et Johannes KERR. *Biochem. Zeitsch.*, 40, 498 (1912).

En soumettant la combinaison du mercure à l'action de H^2S on obtient des Amino-Acides très purs. On a :



Pour faire la précipitation on emploie une solution d'acétate de mercure à 25 % et une solution à 10 % de carbonate de sodium. La solution d'acétate de mercure est préparée à froid ou en chauffant tout au plus à 40°, on ajoute par petites quantités au liquide qui contient les acides aminés, l'acétate de mercure, ensuite le carbonate de sodium à la température ordinaire jusqu'à réaction alcaline au tournesol. La précipitation faite, on ajoute encore du carbonate de sodium et de l'acétate de mercure jusqu'à une nuance jaune rouge, il faut ajouter également 5 à 8 volumes d'alcool à 98°. Il faut, en tous les cas, faire la précipitation avec un liquide toujours alcalin. Après sédimentation, on filtre et on lave le précipité avec de l'alcool à 80 %. Le précipité suspendu dans un volume abondant d'eau distillée est décomposé par H^2S . Filtration et évaporation de l'eau = résidu constitué par les amino-acides.

VII. — Dosage de l'Azote des Acides aminés de la série grasse. (1)

Il est connu depuis longtemps que le groupement NH^2 entre en réaction suivant l'équation $R - NH^2 + NO^2H = R - OH + H^2O + N^2$.

La méthode ci-dessus se base sur le fait que NO^2H se décompose directement, en :

(1) DONALD et VAN SLYKE. *Journ. of biolog. chem.*, IX, 485 (1911).

$(\text{NO}^2\text{H})_3 = \text{NO}^3\text{H} + 2\text{NO} + \text{H}^2\text{O}$: Le gaz NO doit remplacer l'air atmosphérique dans notre appareil à analyses. Pour absorber le gaz NO, on emploie une solution de : $\text{MNO}^4\text{K} + 25$ gr. de KOH par litre.

La réaction se fait en D (flacon de 35 à 37 cc.) muni d'un bouchon à quatre tubulures fixé avec du fil de fer sur D. On n'emploie que des tubes capillaires dont le diamètre extérieur est de 6 à 7 millimètres. A l'exception du tube A qui a 2 millimètres A contient de l'eau pour déplacer l'air atmosphérique de D, ou sert à recevoir le liquide qui remonte sous la pression du gaz NO. B (10 cc.) contient le liquide à analyser, C, est la conduite du gaz, E contient de l'alcool amylique qu'on doit verser dans D si la réaction devait y être trop tumultueuse. Trois phases dans le procédé :

1° Remplacement de l'air atmosphérique dans l'appareil par NO;

2° Décomposition de l'acide aminé;

3° Absorption de NO et dosage de N par gazométrie.

Mode d'emploi de l'appareil.

La solution aminée ne contenant pas plus de 20 milligr. de N d'amino-acide est placée dans B (5 cc. dans A), on introduit dans D 28 cc. d'une solution de nitrite de sodium, 30 gr. de sel, 100 gr. d'eau, puis 7 cc. d'acide acétique. Le robinet C est ouvert, le bouchon à quatre tubulures est fixé par le fil de fer sur B, ensuite on laisse entrer l'eau de A jusqu'à ce que D soit complètement rempli et que le liquide monte dans C (C est fermé, A reste ouvert) et D est agité, ce qui produit une montée de 10 à 15 cc. de liquide dans A. C ouvert

et NO et les restes d'air atmosphérique sont chassés en réouvrant A. Alors C fermé, D agité, A ouvert, une grande partie du liquide de D remonte dans A, G et H sont complètement remplis d'une solution de permanganate de potasse. F est rempli de $\text{SO}_4 \text{H}_2$ à 1% jusqu'au bouchon à deux ouvertures, KC, est joint à F, C ouvert et A fermé. Ensuite on laisse couler la solution aminée dans D en ouvrant B; on referme B, ensuite se développe un dégagement rapide de N et NO. Cinq minutes écoulées, on agite D, on ouvre A et C, et on chasse les gaz dans F, en levant Y au-dessus du niveau, les gaz sont chassés dans F, NO est absorbé par MNO_4K dans la burette à gaz. L'azote qui reste est rechassé dans F et son volume est mesuré.

VIII. — Dosage de l'azote des Amino-Acides dans le sang. (1)

30 à 50 cc. de sang frais sont mélangés avec 8 ou 10 volumes d'alcool à 95° afin de précipiter l'albumine, on note le volume du mélange, le tout bien mélangé, on laisse reposer 24 heures. Filtration dans un cylindre gradué sans laver le précipité. Le volume filtré est également noté et pris pour l'analyse comme partie aliquôte du mélange entier sans alcool. Concentré à 5 cc., il est analysé par la méthode de Van Slyke.

IX. — Dosage de l'Azote total des Amino-Acides dans l'Urine. (2)

Ajouter 5 cc. de $\text{SO}_4 \text{H}_2$ concentré à 75 cc. d'urine.

(1) G. MEYER et VAN SLYKE, *Journ. of biol. chem.*, XII, 399.

(2) *Journ. of biol. chem.*, XII, 301.

Chauffer le tout dans l'autoclave à 175°, pendant une demi-heure. Verser ensuite dans un récipient de 300 cc., ajouter 5 à 6 gr. d'hydrate de calcium pulvérisé et faire bouillir jusqu'à ce que la vapeur ne réagit plus sur le papier tournesol. Ajouter de l'eau s'il est nécessaire; ordinairement l'ammoniaque s'est évaporé après une heure. Filtrer et laver le précipité avec 10 fois son poids d'eau chaude. Concentrer au bain-marie, filtrer dans un flacon, prendre 10 cc. et doser selon la méthode de Van Slyke.

*Dosage de l'azote des Amino-Acides dans
quelques polypeptides par la méthode de Van Slyke.*

(ABDERHALDEN et VAN SLYKE).

La réaction de l'acide azoteux sur le groupement NH^2 donne :



et a été proposée depuis longtemps pour le dosage de l'azote des Amino-Acides. Aucune méthode employée jusqu'ici n'a donné de bons résultats. M. Van Slyke a repris l'étude de cette réaction et décrit une méthode ainsi qu'un appareil qui, d'après l'auteur, donne d'excellents résultats. Cette méthode consiste essentiellement à faire réagir sur le corps à doser une solution d'azotile de soude en présence d'acide acétique. La réaction ne donne, à l'exception de l'azote, aucun autre gaz que du bioxyde d'azote qui est absorbé par MnO^4K en solution alcaline, de sorte que le volume d'azote dégagé peut être évalué avec une grande précision. En plus, le dosage peut être effectué sur des quantités très minimales de produits. Autant que possible, dans un do-

sage, on ne doit pas dégager plus de 0.020 milligr. d'azote. Abderhalden et Van Slyke ont essayé ce procédé pour le dégagement de l'azote des polypeptides et dans ce but ils ont dosé l'azote dans un grand nombre de ces dérivés et ont constaté que l'azote dégagé correspondait exactement aux chiffres théoriques. Cependant les polypeptides dans lesquels le groupement aminé est fixé au Glycocölle font exception à la règle car ils donnent toujours un excédent d'azote. Cette augmentation en teneur d'azote n'est pas considérable et en multipliant par 0,8 le poids donné on arrive à un dosage exact.

X. — Méthode pour extraire les Acides aminés du sang. (1)

Elimination de l'albumine après avoir chauffé à 80° et extraction des Amino-Acides avec de l'alcool à 10 % en présence d'un sel de baryum. Le sang frais est défibriné, une partie séchée à 70°, une autre partie centrifugée et séchée également à 70°. De cette manière, on obtient une poudre et du sang total et du sérum. Dans le cas où les globules du sang sont séchés rapidement à 70°, on centrifuge le sang défibriné pendant deux heures en séparant ainsi autant que possible le sérum. La substance est agitée pendant 3 heures avec 150 à 200 cc. d'alcool à 10 %, on ajoute 3 à 4 gr. de BaCl_2 , 1 à 2 gr. de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, et 0,5 à 1 gr. de $\text{PO}_4 \text{H} \text{Na}_2$. Le liquide doit être toujours alcalin, on filtre. On ajoute au filtratum une solution de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturée et on filtre de nouveau. Le liquide filtré doit être com-

(1) COSTANTINO. *Bioch. Zeitsch.*, 54, 91, 55, 419.

plètement clair et à peine coloré; le dosage des Amino-Acides est fait au formol en employant N/5 Na OH qui ne contient pas de CO².

XI. — Procédé de dosage des Amino-Acides dans le sang.

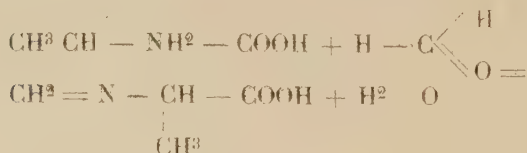
1° DELAUNAY. — *Compte rendu de biologie*, 73, 492 (1913).

L'auteur emploie la précipitation des protéines par l'acide métaphosphorique et fait la titration au formol.

2° HENRIQUES et SORENSEN. — *Zeitsch. physiol. chem.*, 60 (1909).

Ces éléments, notamment le glycoecolle, ont été signalés dans une urine normale et pathologique, on a proposé plusieurs procédés. Henriques a essayé le procédé au formol donné par Sorensen. La solution neutralisée au préalable et traitée par formol demi neutralisé, la fonction NH² de la molécule est transformée en = N —. Le caractère amphotère de l'alcali-acide ayant disparu, l'acidité du carboxyle de l'Amino-acide apparaît et se titre avec alcali. On a :

ALANINE + FORMOL



Mais les sels ammoniacaux réagissent sur CH²O formant de l'hexaméthylène tétramine avec mise en liberté de l'acide (Ronchèse). Aussi faudra-t-il doser NH³ dans un certain volume d'urine; retranchant de N

calculé par la réaction du formol, le N ammoniacal obtenu par détermination directe, on obtiendra N des alcalis acides. Sorensen a montré que ni l'urée, ni la créatine, ni la créatinine ne se combinent avec le formol dans ces conditions. De même pour l'acide hippurique. La présence de polypeptides dans l'urine, s'il en existe, donnerait des résultats trop faibles, on fait une hydrolyse au préalable et on titre au formol ensuite. L'auteur fait le dosage avec Baryte N/5. Il met dans un vase jaugé de 100 cc. 50 cc. d'urine, ajoute 1 cc. de solution de phtaléine à 1 ou 2 % et 2 gr. de BaCl_2 , il agite et ajoute $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en solution jusqu'à coloration rouge, puis 5 cc. de la même solution pour précipitation des phosphates. Il complète à 100 cc., agite de nouveau, laisse reposer et filtre, après prélèvement de 80 cc. du filtrat équivalent à 16 cc. d'urine, et neutralisation avec solution HCl N/5. Il ajoute formol à demi neutralisé, puis Baryte N/5. Le nombre de cc. multiplié par 2,8 donne le nombre en milligr. de la prise d'essai.

XII. — Méthode d'E. Fischer pour l'étherification et la séparation des Acides mono-aminés (1), (2).

Cette étherification fait suite dans l'hydrolyse des matières protéiques : 1° A la séparation des phosphotungstates insolubles et à l'isolement des acides diamidés des corps puriques et pyrimidiques.

2° A l'élimination de l'excès du réactif phosphotungstique, à la séparation de la Tyrosine, de la Leu-

(1) *Ber.* XXXIX, p. 585.

(2) Albert MOREL. *Précis de technique chimique*, 540.

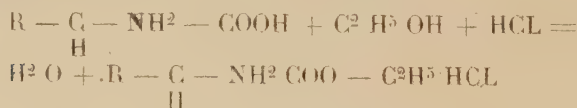
ciné, l'Alanine et la Valine par cristallisations fractionnées.

1^{re} opération. — La marmite où se trouve le résidu visqueux que l'on a traité par de la Baryte pour précipiter SO^4H^2 et ensuite par CO^2 pour éliminer l'excès de Baryte, est remplie aux trois quarts avec 2 litres d'alcool absolu. Dans ce milieu on fait passer un courant de gaz chlorhydrique desséché dans des barboteurs à SO^4H^2 . Il y a dissolution des Amino-Acides; la température s'élève. On agite bien le mélange pour que la combinaison chlorhydrique s'opère dans de bonnes conditions.

On verse la solution dans un ballon à fond rond; on lave la marmite avec de l'alcool, et on évapore cet alcool dans le vide.

On recommence deux ou trois fois cette même opération d'étherification et d'évaporation dans le vide jusqu'à dissolution totale des combinaisons des Amino-Acides.

Il se passe la réaction suivante pour les acides alpha aminés :



2^e opération. — Cristallisation du chlorhydrate d'éthyl Glycocolle. — Le ballon contenant les chlorhydrates d'éther des différents acides aminés est placé dans une glacière; et sur le milieu constitué par la masse pâteuse, on frotte avec un agitateur à l'extrémité duquel se trouvent quelques cristaux d'éthyl Glycocolle. On sépare les cristaux à mesure qu'ils se

forment, et on laisse le ballon 24 heures dans le mélange réfrigérant. On essore les cristaux à basse température et on les lave avec de l'alcool refroidi à 0°.

3^e opération. — Mise en liberté des éthers. — La masse des chlorhydrates restés dans le ballon est soumise de nouveau à l'action du vide pour éliminer la totalité de l'alcool, ensuite placée dans un mélange réfrigérant. On lui ajoute de l'eau distillée à 0°, la moitié du volume initial. On ajoute pour parfaire la dissolution dans le milieu toujours soumis à l'action d'un mélange réfrigérant. On ajoute deux volumes d'éther éthylique pur; on fait descendre la température à — 5° par un mélange de glace et de sel; on neutralise rapidement le milieu par de la soude sortant de la glacière. On agite le ballon, on replace à la glacière et dès que l'éther s'est réuni on le décante dans un flacon séché et refroidi à 0°. On ajoute de nouveau le même volume d'éther et on fait tomber dans le milieu du carbonate de potasse sec. On agite. On laisse reposer, toujours dans le mélange réfrigérant; on décante l'éther et on le réunit au premier. On recommence cette addition d'éther et de carbonate de potasse jusqu'à obtention d'une véritable pâte et jusqu'à ce que l'éther évaporé ne donne plus de résidu charbonnant.

Variantes de la technique. — Fischer a proposé l'alcool absolu glacé au lieu de l'éther. On élimine HCl par une solution de Sodium dans l'alcool, et les combinaisons éthyliques des Amino-Acides passent ainsi dans l'alcool.

Levene et Alberg (1) remplacent la soude et le car-

(1) *Journ. of biol. chemistry*, 11, 127.

bonate de potasse par de la Baryte en poudre. La-masse pâteuse ainsi constituée sera reprise par de l'eau et on précipitera l'excès de Baryte par SO^4H^2 . On séparera le sulfate de Baryte; on évaporera, refera l'étherification par Hcl et alcool, mettra de nouveau en liberté les éthers jusqu'à obtention de tous les Amino-Acides sous la forme d'éther éthylique.

4^e opération. — Fractionnement des éthers par E. Fischer (1) et (2). — Ces solutions éthyliques d'Amino-Acides dans l'éther éthylique sont traitées sans retard par du carbonate de potasse desséché, ensuite par du sulfate de soude anhydre, avec lequel on les laisse en contact à la glacière durant douze heures.

Avec toutes les précautions contre l'incendie, et sans dépasser la température de 75° on évapore les solutions éthérées au bain-marie. L'éther distillé est recueilli dans un flacon à vide refroidi à 0° et transvasé dans un autre flacon — au fur et à mesure de la distillation, car il entraîne avec lui un peu d'éthyl glycolle et Alanine. — On lui ajoute Hcl qui dissout ces éthers que l'on joindra à la portion du premier fractionnement. Ensuite, l'éther traité par du sulfate de soude anhydre pourra de nouveau servir à épuiser les éthers d'Amino-Acides.

Le résidu de l'évaporation de cet éther éthylique est versé dans un grand ballon en verre d'Iéna, à tubulure latérale, communiquant avec un 2^e ballon où l'on fait le vide avec un bon appareil (bonne trompe, ou mieux machine pneumatique mue par un moteur) et

(1) *Untersuch ub Aminosoeuren*, p. 581.

(2) Albert MOREL. *Précis de technique chimique*, 543.

plongeant dans un mélange réfrigérant. Le 1^{er} ballon porte un bouchon à deux ouvertures dont une laisse passer un thermomètre et l'autre un tube bouché par un fragment d'agitateur muni d'un petit morceau de caoutchouc (tube de Wurtz). On chauffe progressivement le bain-marie en ayant soin que le manomètre marque une pression inférieure à 15 millimètres. On doit faire les fractionnement suivants, en prenant la température dans le bain-marie :

1 ^e fraction	40°
2 ^e fraction	40-55°
3 ^e fraction	55-80°
4 ^e fraction	80-100°

Une fois ces températures mesurées justes au bain-marie, on arrête la chauffe et l'action du vide; on laisse rentrer l'air en enlevant le fragment d'agitateur placé sur l'une des ouvertures du bouchon du premier ballon, et on vide le contenu du deuxième ballon, où se sont récupérées les vapeurs de l'Amino-Acide éthérifié, dans un flacon numéroté. La température d'ébullition atteinte, on continue la distillation en se servant, cette fois, d'une machine pneumatique mue par un moteur. Cet appareil permet d'arriver à une pression qui n'est pas supérieure à 0 millim. 5. Les vapeurs sont réunies dans un récipient à air liquide de Dewar. On n'a ainsi aucun départ dans l'appareil et les vapeurs de NH_3 et d'alcool qui peuvent se former par décomposition des éthers et empêcher la vide d'être suffisant viennent également s'y condenser.

Fischer conseille de ne pas poursuivre la distillation au-delà de 110-120° si l'on n'a pas à sa disposition un

appareil aussi parfait pour la réfrigération et le vide, car les éthers se décomposeraient.

On attèle le ballon contenant les éthers à l'appareil de Fischer. On chauffe avec un bain d'huile et on recueille ainsi :

une 5 ^e fraction à.....	100-110°
6 ^e fraction à.....	110-160°

et le résidu coloré resté dans le ballon constitue la 7^e fraction.

Extraction des Amino-Acides de leurs éthers.

Pour empêcher une décomposition de ces différents éthers contenus dans ces diverses fractions, ces dernières doivent être traitées sans retard.

1^{re} fraction 40°. — On a dans cette fraction un peu d'éther éthylique avec un peu des éthers du Glycocolle et de l'Alanine. On traite cet éther de la même façon que la plus grande partie de l'éther distillé.

Fraction 40-55°. — On a ici les éthers du Glycocolle, de l'Alanine, avec un peu de celui de Valine. On ajoute les chlorhydrates de Glycocolle et d'Alanine déjà formés et recueillis à part.

On traite par alcool et Baryte, on évapore à part l'alcool mère de l'éthyl glycocolle; le résidu dissous dans l'eau distillée et traité pendant deux heures au réfrigérant ascendant. L'eau est chassée par évaporation vide. De même, se traite la portion non cristallisée contenant l'Alanine mêlée d'un peu de Valine.

Fraction 55-80°. — On a dans cette fraction les éthers de l'Alanine, de la Valine, de la Leucine, de la Proline. On dissout la masse dans l'eau et on fait bouillir deux heures au réfrigérant ascendant. L'eau est évaporée dans le vide. Le résidu est traité par l'alcool absolu bouillant qui dissout la Proline et laisse l'Alanine, la Valine et la Leucine qu'on sépare par cristallisations fractionnées.

Fraction 80-100°. — Ce sont les éthers de l'Alanine, de la Valine, de la Leucine, de la Proline et de la Sérine qui y sont assemblés. On ajoute à cette fraction de l'éther de pétrole qui les solubilise tous, sauf celui de la Sérine. Cette Sérine éthylique ainsi isolée sera saponifiée avec de l'eau et fournira la Sérine.

L'éther de pétrole est évaporé dans le vide, et le résidu est saponifié. L'Alanine, la Valine, La Leucine et la Proline seront obtenues comme précédemment.

Fraction 100-110°. — Elle contient les mêmes éthers que la fraction précédente; elle est donc traitée comme elle.

Fraction 110-160°. — On a ici les éthers de la Sérine, de la phényl-Alanine, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique, des polypeptides. A cette portion on ajoute quelques cc. d'eau et huit volumes d'éther de pétrole. L'éther de la Sérine insoluble se précipite sous forme d'huile. On le recueille et on le saponifie.

On distille dans le vide l'éther de pétrole. On dissout le résidu dans 5 fois son poids d'eau, et on agite avec de l'éther à 65° qui dissout l'éther de la phényl-Alanine. On évapore l'éther. Le résidu est dissous dans eau de Baryte et saponifié au réfrigérant ascendant pendant

cinq heures. La Baryte est enlevée par SO_4H^2 dilué. La solution aqueuse est ensuite évaporée. On a dans le résidu de la Phenyl-alanine impure.

La solution aqueuse est additionnée de Baryte et chauffée pendant 5 heures au réfrigérant ascendant. Ensuite on élimine la Baryte par CO_2 jusqu'à réaction acide et on filtre le liquide bouillant et on épuise le précipité barytique par eau distillée bouillante, et cela jusqu'à ce que cette eau évaporée n'abandonne plus de matières organiques. On concentre la solution dans le vide et sur le résidu on fait passer HCl gazeux. On met le mélange dans glacière et on amorce avec des cristaux de chlorhydrate d'acide glutamique. Les cristaux sont séparés et essorés; on les joint aux cristaux de chlorhydrate d'acide glutamique obtenus déjà dans la troisième opération de la troisième série, c'est-à-dire obtenus directement par action de HCl gazeux sur le résidu non cristallisé et insoluble de l'hydrolyse.

Le résidu sirupeux est traité par un peu d'eau et débarrassé de HCl par l'oxyde de plomb. Le chlorure de plomb peu soluble se sépare. On traite par baryte en solution et on place dans un mélange réfrigérant. La combinaison barytique de l'acide aspartique se dépose. Les eaux mères seront de nouveau traitées par le même procédé; l'acide aspartique sera retiré sous la forme de sel de Baryte, l'acide glutamique sous la forme de chlorhydrate. S'il y a des polypeptides dans le milieu, on le traitera par SO_4H^2 , de façon qu'il y ait 5 % de SO_4H^2 et on précipitera par le réactif phosphotungstique, on aura ainsi ces polypeptides sous la forme de phosphotungstates peu solubles.

La 7^e fraction est constituée par le résidu de la dis-

tillation. Il y a de l'éther de la Sérine, des éthers de polypeptides plus ou moins complexes, et de substances non définies, avec les mêmes éthers que ceux de la fraction précédente. Le même procédé est donc à appliquer avec cette différence qu'il sera plus pénible de séparer et de séparer tous ces éléments.

Méthode pour extraire les Acides Aminés du sang.(1)

Modification de la méthode Fischer-Bergell.

5 litres de sang sont mélangés à cinq litres d'eau, 10 litres d'acide chlorhydrique à 2% et 10 litres d'eau de bi-chlorure de mercure à 5 %. Le tout est filtré après peu de temps et le mercure précipité par l'action de H^2S , cet H^2S est chassé autant que possible par un courant d'air. On neutralise minutieusement par portions de 6 litres et concentre au vide jusqu'à 500 cc. à une température qui ne doit pas dépasser 60°. Ensuite on ajoute une solution de NaOH à 33 % jusqu'à la réaction alcaline du tournesol. Il faut, environ, 1,5 cc. de la solution de NaOH; filtration pour enlever les sels de phosphates. Ensuite le liquide est agité pendant 9 heures avec 100 cc. d'une solution étherée à 5 % de chlorure d'acide Béla-naphtalène sulfonique : $C^{10}H^7SO^2CL$.

De trois en trois heures on contrôle la réaction alcaline (tourne-sol) et on ajoute quelques gouttes de NaOH, jusqu'à réaction nette du tournesol. Après séparation de l'éther et filtration, on acidule avec de l'acide chlorhydrique, ce qui cause une forte précipitation qui est

(1) COSTANTINO et BINGEL. *Zeitsch. für physiolog. chem.*, 57. 382.

absorbée par l'éther en la secouant avec ce dernier. L'éther est lavé avec de l'eau pour enlever le chlore et on distille. Il reste un résidu jaunâtre, huileux, qui se dissout en grande partie lorsqu'on ajoute de l'ammoniaque jusqu'à la réaction neutre ou faiblement alcaline au tournesol. Le résidu est l'amide de l'acide Béta-naphtalène sulfonique. Il est agité avec de l'éther en quantité suffisante à plusieurs reprises et obtenu après évaporation de cet éther, il cristallise : Point de fusion 216.

Après séparation de l'amide, de l'acide Béta-naphtalène sulfonique, le liquide ammoniacal est acidulé avec HCL et le précipité dissout dans l'éther qu'on évapore. Le liquide restant, complété avec de l'eau à 30 cc., est chauffé au bain-marie et filtré à chaud. Le liquide refroidi, on introduit dans le milieu une parcelle cristalline de Glycocolle de l'acide Béta-naphtalène sulfonique. La cristallisation commence bientôt à la température ordinaire et est terminée dans la glacière.

Le précipité resté sur le filtre est soumis au même procédé.

Les cristaux reçus ainsi sont recristallisés à plusieurs reprises. Point de fusion 150. On obtient sur 10 litres de sang : 0 gr. 35 après la première cristallisation, 0 gr. 27 après la deuxième et 0 gr. 21 après la troisième.

L'analyse élémentaire donne les résultats suivants :

0 gr. 1336 de substance ont donné	{	0,2688 de CO ²
		0,0544 de H ² O

Trouvé : en C 54,87 % et en H 4,55

Calculé : 54,73 % 4,15

pour la formule C¹² H¹¹ O⁴ N⁵,

Un autre procédé pour obtenir le Glycocolle de l'acide Béta-naphtalène sulfonique est de provoquer la précipitation (du liquide neutralisé exempt de l'amide, de l'acide Béta-naphtalène sulfonique) en ajoutant à ce liquide rempli à 40 cc. une solution de BaCl_2 . Filtrer et laver avec un peu d'eau froide. Le précipité et le filtrat sont décomposés avec HCl et les combinaisons de l'acide Béta-naphtalène sulfonique sont solubilisées dans l'éther, on évapore cet éther dans le vide et la cristallisation se produit.

On peut aussi employer le mode suivant :

100 cc. de sang ou de sérum sont mélangés avec 500 cc. d'eau sublimée à 2 % qui contient 0,9 % de HCl . On agite le mélange dans un récipient fermé, on laisse reposer pendant quelques heures et on agite de temps en temps, on centrifuge 10 minutes, on décante, on filtre dans un cylindre gradué, on précipite le mercure par H_2S , on filtre, on chasse par un courant d'air, on neutralise et on concentre au bain-marie, on chasse l'ammoniaque par distillation dans le vide à 45° avec MgO . Le dosage de l'acide aminé se continue d'après la méthode précédente.

XIV. — Dosage d'acide aminé dans l'urine. (1)

On précipite dans l'urine les substances avec l'acétate de plomb. Le plomb est enlevé par H_2S , H_2S est chassé par un courant d'air, après filtration de PbS . L'acide hippurique doit, en tous les cas, être éliminé.

(1) HOFMEISTER, BEITRAGE, *Zur physiolog. chemie* (EMBDEN et REESE).

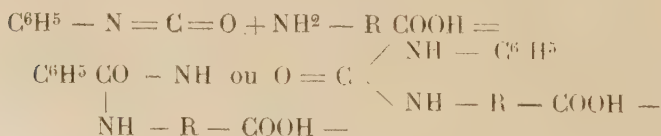
A cet effet, on agite le liquide filtré avec de l'éther acétique (agitations à répéter), l'éther acétique doit être de 1/5^e du volume du liquide à extraire. On ajoute ensuite de l'éther qui capte l'éther acétique, le liquide restant est concentré au bain-marie, on y ajoute NaOH jusqu'à forte réaction du tournesol. Il faut au moins 50 cc. de NaOH normal pour un litre d'urine. Le liquide alcalin est ensuite agité pendant 2 jours avec une solution éthérée de chlorure de l'acide Béta-naphtalène sulfonique à 10 %. On agite avec agitateur mécanique à une température de 30°, en ajoutant de temps en temps de la solution de NaOH et de celle du chlorure de l'acide Béta-naphtalène sulfonique, 4 à 6 fois par jour.

Les extraits d'éther réunis et lavés avec un peu d'eau sont évaporés dans le vide.

Continuation de la même méthode.

Une septième méthode a été décrite pour l'obtention des Amino-Acides à l'état de combinaison complexe. C'est la combinaison d'Amino-Acide avec l'acide phényl ou Naphtyl isocyanique.

La fonction aminée de l'Amino-Acide se combine avec le corps précité pour former une phényl Hydantoïne ou une Naphtyl Hydantoïne, par deshydratation de l'urée obtenue.



Fischer et Moumyrat (1) pour l'obtention de la pro-

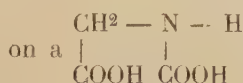
(1) *Ber.*, XXXII, p. 2.385,

line phényl lydantoïne opèrent de la façon suivante :

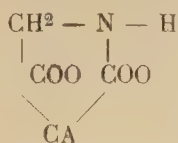
Ils dissolvent 1,8 de Proline dans 15 cc. de soude normale en refroidissant à 0°, puis ajoutent peu à peu, en agitant, 2 gr. d'isocyanate de phényl, acidifient la solution par Hcl pour obtenir une solution à 4 % de cet acide, chauffent au bain-marie une heure et séparent les cristaux formés. Le point de fusion est 144°.

La Leucine a été séparée de cette façon par Neuberg et Manasse (1) PF = 125. La phényl Alanine, l'Ornithine, la Lysine, le Tryptophane et la Glucosamine ont été également caractérisés par cette combinaison.

8° Il y a la réaction carbaminique de Siegfried (2). Les Amino-Acides et les corps organiques dont ils dérivent, protéines et peptides, en solutions étendues et froides, alcalinisées, fixent le gaz carbonique en remplaçant un hydrogène du groupe NH² de l'Amino-Acide par COOH. Si on a affaire au Glycocolle



et dans le cas d'un sel calcique



Si on décompose la solution du corps ainsi formé par la chaleur, il se dépose du carbonate de chaux et l'Amino-

(1) *Ber.* XXXVIII, p. 238.

(2) SIEGFRIED. *Zeit für phys. chem.*, 44-85, 1905; 46-401, 1905.

(3) SIEGFRIED et NEUMANN, 54-423, 1908.

(4) SIEGFRIED et LIBERMANN, 54-437, 1908.

no-Acide est régénéré. En dosant CO^3CA , et l'azote, et en divisant le poids du carbonate de chaux par le poids moléculaire, et le poids d'azote par son poids atomique on a

$$\frac{\text{CO}^3 \text{ CA}}{\text{N}} = 1$$

Avec l'Histidine et l'Arginine, seul le groupe NH^2 voisin du carboxyle entre en réaction. Or comme respectivement ils ont trois et quatre atomes d'azote, le rapport CO^3CA sera plus petit que l'unité.

$$\text{on aura } \frac{\text{CO}^3 \text{ CA}}{\text{N}} = \frac{\text{X}}{\text{I}}$$

$\text{X} = 3$ avec Histidine et $\text{X} = 4$ avec Arginine.

Le coefficient X dépendra du nombre de NH^2 libérés de l'enchaînement de polypeptides complexes. On pourra avec précision suivre une hydrolyse et Henri Mathieu (1), après avoir excellemment décrit le procédé de Siegfried l'a mis à profit pour décrire l'action plus ou moins énergique des acides sur les protéines.

Méthode. — Une prise de 40 cc. de liquide (selon l'application qu'en a fait Mathieu) est diluée à 50° ; on refroidit dans la glace à 0° ; on ajoute du lait de chaux refroidi à 0° (10 cc.) jusqu'à coloration rose avec phthaléine. On fait passer CO^2 jusqu'à décoloration en agitant. On ajoute de nouveau du lait de chaux refroidi à 0° pour recolorer. On fait passer CO^2 une 2^e fois qui décolore; une 3^e fois on reverse le lait de chaux refroidi à 0° ; un courant de CO^2 décolore une 4^e fois, et

(1) *Hydrolyse des protéines par les Acides. Journal de phys. et pathol. génér.*, 1909, p. 393.

en dernier lieu on ajoute de nouveau un lait de chaux jusqu'à réaction alcaline. On filtre à la trompe. La solution limpide est transvasée dans un Erlenmeyer contenant de 100. à 150 cc. d'eau distillée privée de CO_2 par ébullition. On le bouche avec un tube à chaux sodée. On porte le liquide à l'ébullition et on laisse reposer plusieurs heures. Le liquide doit rester rouge. On filtre CO_3CA dans un creuset taré. On dessèche à étuve à 110° pendant 2 heures et on pèse. On dose dans le liquide N par la méthode de Kjeldahl. Les prises d'essai de Mathieu contenaient en N une valeur de 15 à 20 cc. de NH_3 deci normale.

9°. Dakin (1) donne un procédé qui permet de séparer les mono-Amino-Acides des acides diaminés ou des peptides.

Le liquide aqueux contenant le mélange d'Amino-Acides est agité avec alcool butylique.

1° Dans les eaux mères aqueuses restent les di-Amino-Acides et l'Asparagine;

2° Les mono-Amino-Acides se déposent en cristaux dans l'alcool butylique; dans les eaux mères de cet alcool se trouve la Proline.

De l'historique restreint des Amino-Acides du lait il se dégage assez facilement :

1° Que la présence mentionnée de la Leucine dans le lait est peut-être la résultante, sinon d'une supposition, du moins d'un examen microscopique. On n'a pas de données sur la teneur de cet élément dans l'azote non protéique contenu dans la portion soluble séparée des protéines du lait par le réactif phosphotungstique.

(1) *Biochemical Journal*. T. 12, p. 290-517, décembre 1918.

2° Le dosage de l'azote, effectué dans le filtratum du lait traité par le réactif phosphotungstique, représente pour quelques auteurs l'azote des Amino-Acides. Rien n'est moins précis et élucidé que ce dosage, car si l'on s'en tient aux suppositions des auteurs, l'azote non protéique du lait serait représenté par une multiplicité de corps, tels que les Amino-Acides, l'urée, la Créatine, la Créatinine, la Sarcine, la Xanthine, l'Hypoxanthine, et peut-être d'autres dérivés tels que l'Ammoniaque, les sulfo-cyanures et les Nucléones.

3° Il reste donc à connaître, dans cet azote total des produits azotés non protéiques du lait de vache, la part qui revient aux Amino-Acides.

4° Les méthodes de dosage des Amino-Acides décrites par les auteurs compétents peuvent se résumer à huit.

α Titration par un alcali de l'acidité produite par l'addition du Formol dans un milieu contenant un Amino-Acide. Ce procédé ne réussit pas dans le lait pour des raisons exposées (p.).

β Dosage des Amino-Acides avec le chlorure d'acide Béta-naphtalène sulfonique. Ce procédé exige un réactif assez difficilement trouvé. En plus, d'après les renseignements que donnent les auteurs, il serait d'une application très délicate.

γ Dosage de l'azote des Amino-Acides par le Nitrite de sodium en milieu acétique. Ce procédé constituerait une bonne évaluation de l'azote des Amino-Acides. Mais d'autres corps azotés, tels que l'urée et la Créatine, pourraient transformer également leur fonction $R-NH^2$ en $R-OH + N$. En plus notre but, dans le

lait, est de faire une recherche qualitative et quantitative des Amino-Acides.

En ce qui concerne l'urée on aurait la réaction suivante, par addition de NO^2H .



Or l'urée a été trouvée comme élément normal du lait (1). Il faudrait donc un dosage préalable de ce corps pour mesurer exactement la valeur du procédé Van Slyke pour le dosage de l'azote des Amino-Acides du lait.

Δ Titrage colorimétrique des Amino-Acides par l'hydrate de triccétohydrindène. — Dans le lait cette méthode est inapplicable à cause des hydrates de carbone qui donnent également une coloration avec le réactif.

E) Précipitation des Amino-Acides, en milieu alcalin, avec l'acétate de mercure. — Ce procédé, à la portée des plus petits laboratoires, a constitué le procédé que nous avons mis à profit dans notre étude et qui nous a permis d'obtenir des Amino-Acides très purs.

Z La double éthérification de Fischer est applicable à une hydrolyse où une grande quantité d'Amino-Acides restent adhérents au résidu visqueux insoluble, et duquel l'action simultanée de l'alcool absolu et de l'acide chlorhydrique les décolle sous forme de chlorhydrates d'éther. Nous nous servirons de cette méthode pour caractériser le Glycocolle.

η Le dosage des Amino-Acides à l'état de sel de cuivre ne peut être effectué dans le lait à cause des

(1) KOENIG. *Loc. cit.*, p. 7.

hydrates de carbone (Lactose) mélangés aux Amino-Acides.

Θ La méthode de Siegfried, introduisant dans la molécule de l'Amino-Acide un autre groupe COOH, les deux fonctions acides organiques pourront contracter combinaison avec le calcium. On pourra ensuite régénérer l'Amino-Acide en chauffant la solution calcique. Un dosage du carbonate de chaux, d'une part, d'autre part, une évaluation de l'azote, donneront une appréciation exacte des Amino-Acides libérés dans un processus hydrolytique.

χ Les combinaisons des Amino-Acides avec l'acide phényl ou naphtyl isocyanique. — Les urées ainsi obtenues ont des propriétés caractéristiques de cristallisation et de fusion.

γ Enfin, on a vu que les Amino-Acides pouvaient être précipités sous la forme de picrate; qu'ils pouvaient se combiner avec l'oxyde de zinc et qu'on pouvait séparer les mono des di-Amino-Acides, non seulement par le réactif phosphotungstique, mais par l'alcool butylique. La méthode aux sels d'argent a été également employée pour les mono et di-Amino-Acides. De même la transformation des acides aminés en acide alcool correspondant, oxydation de l'alcool, transformation en aldéhyde qui donnera des réactions de coloration par condensation avec les phénols (1), corps avec lesquels ces produits aldéhydiques, en milieu fortement acide, donneront de très belles colorations qui permettront un dosage colorimétrique.

(1) CHELLE. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 1913.

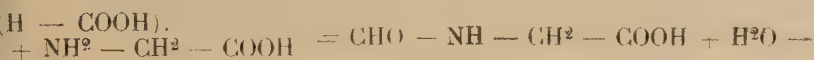
**Formules des principaux dérivés acylés des
Amino-Acides et qui ont servi le plus à leur identifica-
tion par leurs propriétés physiques.**

(points de fusion) (1).

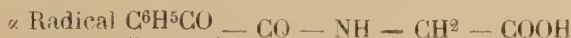
1° Sous l'influence du perchlorure de phosphore un Amino-Acide en dissolution dans une solution bicarbonatée sodique donne le composé suivant avec le chlorure de l'acide acétique.



2° *Dérivés Formylés.*



3° *Dérivés du Benzène.* — Amides benzoïques des Amino-Acides; un oxhydrile de l'acide forme de l'eau avec un H de l'Amine, et crée la liaison amidée.



4° *Dérivés de l'acide benzosulfonique.* — Cette liaison amidée existe aussi avec le dérivé de l'acide benzosulfonique.

(1) FISCHER. *Ber d deutschen chem. Gesellschaft*, XXXIV, p. 437 et suiv.

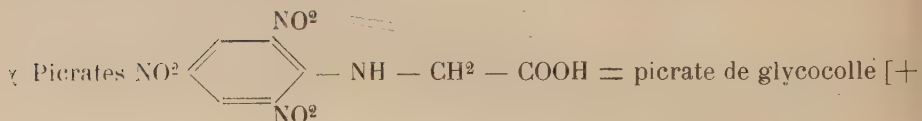
(2) ABDERHALDEN. *Arbeits methoden*, 1912-13, p 1.419 et suiv.

(3) Ces dérivés ont ainsi été appelés par Fischer, à cause de leur caractère fortement acide produit par la disparition de la fonction NH^2 .

β Radical $C^6H^5 SO^o$ —

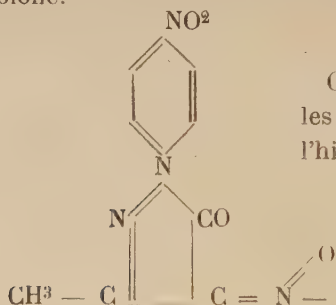


$SO^2 - NH - CH^2 - COOH$



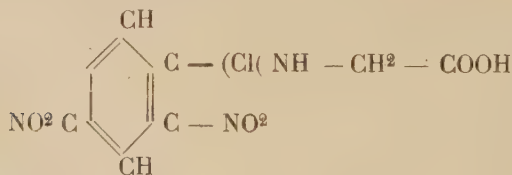
Ici il s'élimine une molécule d'eau. La fonction phénol disparaît. Avec les Amines, l'acide picrique se combine intégralement à la manière d'un acide fort, sans élimination d'eau.

δ Dérivés du Nitrophenyl. 3 methyl — 4 isonitro, 5 pyrazolone.



On a obtenu avec ce corps les dérivés de l'arginine, de l'histidine et de l'ornithine.

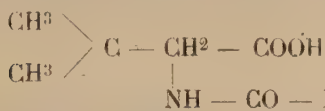
5^o Dérivés du dinitrochlorobenzol.



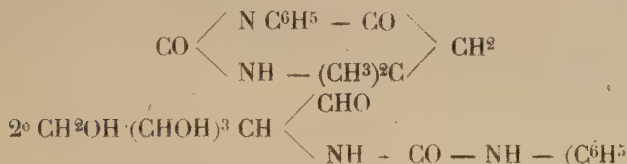
Phényl isocyanates. — L'acide phényl isocyanique $C^6H^5 - N = C = O$ se combine avec l'Amino-Acide et forme une double liaison amidée. Ces corps se trans-

forment sous l'influence de la chaleur et de Hcl en anhydrides.

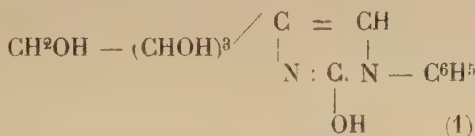
Phényl isocyanate de l'acide amino-iso-valérianique



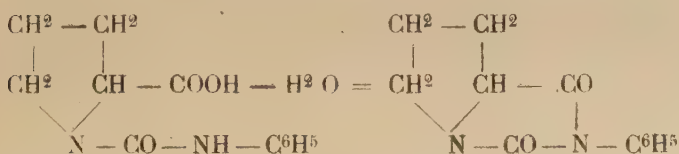
l'Anhydride suivant :



phényl isocyanaté de Glucosamine qui traité par Hcl se résout en l'anhydride.



Phényl isocyanate de l'acide pyrrolidine carbonique.



Dérivés du B Naphtalène sulfo-chlorure.



(1) ABDERHALDEN. *Handbuch der Bioch. Arbeits methoden*, 1912, p. 1.419.

1° = R — SO² — NH — CH² — COOH (dérivé du glycocolle),

2° = R — SO² — N $\begin{cases} \text{CH}^2 - \text{CH}^2 \\ | \quad | \\ \text{CH} - \text{CH}^2 \\ | \\ \text{COOH} \end{cases}$ dérivé de l'acide pyro-
lidine, carbonique ou
proline.

3° COOH — CH² — CH² — CH — COOH
|
NH — SO² — C¹⁰ H⁷ 7

Combinaison de l'acide aspartique avec le B naph-
talène sulfo-chlorure

Combinaison des Amino-Acides avec sels. — A l'ex-
clusion des composés cuivriques, argentiques, zin-
ciques, des dérivés sodiques et calciques déjà mention-
nés, on connaît pour l'Alanine un chloro-platinate



et pour l'acide Amino-Valérianique un chloro-aurate



Les naphtyl isocyanates ont été également prépa-
rés et ont servi à la formation d'urées complexes qu'on
pouvait deshydrater à la façon des phényl isocyanates.



CHAPITRE II

Etude expérimentale de la valeur de quelques Réactifs précipitants et de quelques Méthodes.

I. — Parmi les moyens commodes et à la portée de tous les chimistes pour étudier l'azote soluble du lait ou l'azote total de ce liquide qui n'appartient pas aux matières protéiques, il en est un qui a servi le plus communément aux chimistes qui ont étudié les liquides de l'organisme : c'est la précipitation des matières protéiques dans le milieu où elles sont en dissolution ou en suspension.

De tout l'ensemble de cet azote contenu dans un liquide, en l'espèce dans le lait, et qui peut être constitué par une série de produits hétérogènes, protéines, et produits de transformation tels que peptides plus ou moins complexes, Amino-Acides et autres dérivés du métabolisme, Urée, Créatine, Créatinine, dérivés xanthiques, on fait donc une solution de continuité ou une coupure avec un réactif qui élimine plus ou moins bien les protéines et qui laisse en solution les corps azotés beaucoup plus simples, cités plus haut.

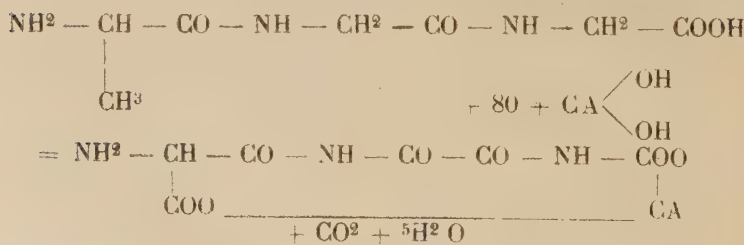
Il s'agit donc d'avoir à sa portée un réactif opérant cette élimination avec le plus de précision, produisant la séparation des deux portions sans dommage et avec le meilleur rendement possible pour l'azote total non protéique où nous nous sommes proposés d'effectuer la recherche des Amino-Acides,

Or le choix d'un réactif pour une opération aussi délicate, et en vue d'un travail scientifique, n'est pas le fait d'une prédilection personnelle; il doit être également issu d'une étude méthodique de plusieurs réactifs précipitants.

Dans l'histoire fait au sujet des différents procédés pour l'isolement des Amino-Acides du sang et de l'urine, nous avons vu les soins particuliers des auteurs pour obtenir une bonne défécation. En raison de l'altération facile des protéines, la dialyse a été employée; ont été également employés des précipitants autres que les réactifs métalliques, l'alcool acide par exemple.

Les protéines peuvent subir des décompositions et nous connaissons déjà quelques-unes de leurs combinaisons faciles, notamment leur combinaison avec le permanganate de K pour former l'acide oxyprotéique (1).

L'oxydation des protéines et des peptides a été étudiée par Eisler (2) avec le permanganate de Potassium. Dans le cas d'un tripeptide il donne le processus suivant d'oxydation et de combinaison ultérieure avec CA



(1) BRUCKE. *Wiener Akad.*, 1881. BODSYNOKI et ZOYA. *Zetk phys. chem.*, XIX, 225.

(2) Bloch- *Zett*, 1913, tome 51.

Ce procédé offre une certaine ressemblance, quant aux résultats, à celui de Siegfried et de Neuberg, qui greffent un carboxyle sur un Amino-Acide. Mais il en diffère par les moyens car les deux premiers, déjà mentionnés, sont des fonctions acides ajoutées intégralement, tandis que le carboxyle provient ici d'une transformation du groupe CH_3 , et en plus les groupes aminés et iminés NH^2 et NH ne sont pas transformés.

Avec l'eau oxygénée on forme les oxyprotéines (1) en présence de mousse de platine.

La Caséine contracte combinaison avec HCl et ClO_3K pour former la chlorocaséine de Panzer (2). De même l'iode, le brome et le chlore produisent dans leur milieu de volumineux précipités (Hopkins et Pinkus (3)). Ces produits purifiés par dissolution dans le carbonate de Na et reprécipitation par acide acétique ont une teneur constante en halogène.

De même, avec les sels, les protéines contractent de véritables combinaisons. On peut du reste les considérer comme un vaste Amino-Acide de formule générale,



Ces deux fonctions opposées peuvent leur donner, comme pour les Amino-Acides, deux aptitudes fondamentales de fixer les éléments de nature basique et de nature acide.

Et c'est précisément cette aptitude à fixer deux fonctions qui fait que les réactifs métalliques addi-

(1) WURSKER. *Ber.*, XX, 263 et 4030.

(2) *Zeit phys. chem.*, XXXII, p. 407.

(3) *Bericht*, XXXI, 1311.

tionnés d'un acide contractent combinaison avec elles et les isolent facilement d'un milieu.

Nous ne nous proposons point ici de traiter les protéines du lait; loin d'avoir une pareille prétention, nous ne faisons que nous rendre aux idées généralement admises qui veulent que les acides peuvent se combiner aux groupes basiques NH^2 des protéines, de même que les alcalis contractent combinaison avec leurs groupes acides COOH .

Mais, qu'est exactement la réaction chimique de ces combinaisons instables? Nul chimiste, tant que la composition des protéines n'aura pas été fixée, ne peut donner une précision à cet égard.

Les matières protéiques sont en effet les plus complexes des matières organiques. La chaleur, les sels, les acides et les alcalis les modifient. Les arrangements atomiques y sont délicats, elles sont unies à une grande masse d'eau et à des matières salines. Additionnées de sels après coagulation, elles peuvent se dissoudre, ces sels déplacent des traces de leurs propres éléments, et, devenant une combinaison autre qu'à leur origine, elles s'insolubilisent dans le même milieu.

Ce sont les réactions de précipitation qui permettent le mieux à l'heure actuelle d'isoler les protéines de certains milieux. Parmi les corps chimiques, précipitant les protéines, par des réactions non encore définies, se trouvent les sels des métaux lourds, les acides organiques et minéraux, certains corps chimiques à fonctions diverses, phénols, alcools et mieux, comme nous l'établirons, par le mélange d'un sel et d'un acide.

Par la précipitation, il peut y avoir simplement changement d'état physique de la protéine qui peut re-

prendre son état primitif. Mais, ici, il y a matière à discussion. Le sulfate d'ammoniaque à saturation, le sulfate de soude, le méta-phosphate de soude précipitent les protéines, sans céder à la molécule étrangère une parcelle de leur molécule métallique, mais, certains autres métaux, comme le tungstène, le fer, le mercure, les métaux lourds et des corps chimiques, comme le phénol (simple ou poly), le tannin, la résorcine ou des alcools, comme l'éthylque, le méthylque, contractent une véritable combinaison avec la protéine précipitée. Isolons du filtrat phosphotungstique les protéines du lait, lavons les très soigneusement avec de l'eau acidulée. Sur une portion aliquote essayons la réaction du formol.



Le groupe NH_2 ne contracte plus combinaison, et le carboxyle COOH , occupé très probablement par un atome métallique, ne peut plus apparaître. Nous verrons en effet, plus tard, que l'action des réactifs précipitants n'est pas toujours la même; les uns semblent avoir un effet mécanique ou physique, en l'espèce la simple précipitation, sans combinaison, les autres, une véritable réaction chimique.

Desséchons cette protéine ainsi traitée par le réactif phosphotungstique et soumettons-là à l'action de la chaleur dans le four à moufle; il reste un résidu pulvérulent où nous avons pu caractériser les réactions du calcium et des phosphates (inhérent à la protéine), mais également du tungstène. Avec le plomb, le fer et

les métaux lourds, il en est de même, et la calcination du produit donne un oxyde métallique dont on pourra tirer les réactions de ces réactifs précipitants. Nous nous bornerons en vue de l'annexe que nous sommes obligés d'effectuer au sujet de la parfaite élimination des protéines du lait, à mentionner que les biologistes les plus compétents se sont rangés, en raison des réactions précises données par chacune des protéines du lait, à l'avis que le lait contient trois protéines :

- 1° Une paranucléoprotéide = la Caséine
- 2° Une albumine = la lactalbumine;
- 3° Une globuline = la lactoglobuline.

L'examen et la discussion de la différence des paranucléoprotéines d'avec les nucléoprotéides, la classification des protéines sont des questions amplement traitées dans les ouvrages de chimie biologique.

Sachant ainsi que l'isolement des protéines d'un liquide physiologique, comme le lait, peut s'effectuer avec des réactifs, nous avons cherché, par une étude systématique, parmi les réactifs déjà connus mais non étudiés pour le cas qui nous intéresse, à connaître quel était le meilleur d'entre-eux pour précipiter les protéines du lait, c'est-à-dire celui qui ne produisant aucune altération de ces dernières, nous laissera dans son filtrat le plus d'azote total, dont nous pourrons retirer les Amino-Acides. Plus un réactif nous donnera d'azote total, plus nous aurons chance de trouver davantage d'Amino-Acides dans ce milieu.

Nous allons donc étudier successivement les réactifs d'Almen, de Tanret, de Mayer, de Brucke, de Deniges, trichloracétique, l'alcool acétique, le métaphosphate de

Na, le phosphotungstique et le silicotungstique, et nous donnerons, avec les résultats acquis, une étude résumée où nous mettrons en parallèle :

- 1° L'aspect des différents filtrats;
- 2° Les réactions colorées générales;
- 3° La valeur de précipitation;
- 4° La valeur azotée totale.

Méthode générale. — Dans 10 cc. de réactif versé dans un verre à réactions, mesurer et verser lentement 10 cc. de lait frais vigoureusement agité au préalable, filtrer rapidement en lavant le précipité avec quelques cc. de réactif, excès qui ne nuit pas (la centrifugation est plus commode que la filtration et donne des filtrats tout aussi clairs que ceux obtenus par filtration). S'assurer par la réaction de Heller, du biuret, xanthoprotéique et quelques autres pour les protéines en général, et de Milon pour la Caséine, que le milieu ne contient plus de protéines.

Evaporer doucement le filtrat au bain-marie jusqu'à réduction à un ou deux cc., reprendre le résidu par 5 cc. de SO_4H_2 auxquels on ajoute pour les réactifs autres que les sels mercuriels 3 ou 4 grammes de SO_4K_2 . Opérer un Kjeldahl dans un ballon en verre de bohème à forme ovoïde au bain de sable (désavantageux pour la durée de l'opération, 3 à 4 heures) mais pratique pour la sûreté de conservation du matériel.

Suivre les conseils classiques pour les Kjeldahl, c'est-à-dire, éviter le boursoufflement de la masse par une douce ébullition (le bain de sable remplit très bien cette condition) et dès lors l'addition d'alcool n'est pas nécessaire. Poursuivre l'action réductrice de SO_4H_2

jusqu'à l'obtention d'un liquide clair, laisser refroidir et verser le liquide sulfurique dans environ 100 gr. d'eau distillée, bien laver et réunir tous les liquides acides auxquels on ajoute de la soude en présence d'hélianthine jusqu'à coloration orangée.

Adapter à l'appareil Aubin et par un entonnoir à robinet, avant la distillation du liquide, ajouter un excès de soude, chauffer et distiller lentement le liquide (une heure à une heure et demi). Recevoir le distillat dans un Erlenmeyer contenant SO^4H^2 N/10, s'assurer avec le papier tournesol qu'il n'y a plus de NH^3 dans le ballon. Au terme de l'opération, ajouter quelques gouttes d'une solution d'hélianthine et mesurer l'excès d'acide non employé à saturer l'ammoniaque libéré par de la NaOH N/10.

(L'hélianthine a été employée parce que ses virages sont très nets avec les acides forts et que l'action de CO^2 sur ce corps est nulle).

Nous mentionnerons, avant d'aller plus loin, les réactions les plus précises des matières protéiques :

1° Réaction du Biuret. — La réaction du Biuret est la plus caractéristique pour les matières protéiques, elle dépasse de beaucoup en précision la réaction de Heller, xanthoprotéique, dérivés azoïques, etc.

Modus faciendi : à une solution de protéine, ou d'un dérivé, tel que peptide, peptone amino-acide, ajouter de la soude jusqu'à franche alcalinisation, puis verser quelques gouttes d'une solution à 1 % de sulfate de cuivre.

Une solution contenant des traces de protéine devient

violette. Si le terme peptone est atteint, on a coloration rouge.

Si le terme peptide est atteint, on a coloration bleue.

Si le terme amino-acide est atteint, on a coloration bleue clair.

Cette réaction n'a point été expliquée, il ne faut pas dans cette réaction un excès de sel cuivrique, 2 à 3 gouttes suffisent, car il y aurait précipitation d'oxyde de cuivre hydraté (Albert Morel, précis de technique chimique, page 406, conseille, dans un cas difficile à trancher entre le bleu et le violet, d'examiner au spectroscope, on a une bande d'absorption comprise entre E et F) des traces de protéine (un 10 millième) ou de produits dérivés de ces corps donnent la réaction du Biuret, alors qu'avec les mêmes traces les réactions de Heller, xanthoprotéique ne réussissent pas. Cette réaction est dénommée « réaction du Biuret », car l'amide allophanique $\text{NH}^2\text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}^2$ est appelé Biuret. Il contient en effet 2 molécules d'urée, et s'obtient par réduction de l'urée à 100° avec trichlorure de phosphore, il donne la réaction violette précitée, et tend ainsi à prouver que les protéines contiennent des groupes chimiques, identiques, tels que CO et NH^2 , et CO NH.

L'hydroxylamine, l'oxaluramide, l'oxamide, la malonamide, donnent cette réaction.

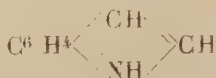
Réaction Glyoxylique. — L'acide glyoxylique contient un groupe aldéhyde et acide et dérive de l'éthane; il peut être obtenu en partant de l'acide oxalique qui est un double carboxyle et dont une de ses fonctions

acides peut être réduite en aldéhyde par l'amalgame de sodium



Cet acide glyoxylique additionné d'un acide fort et mis en présence d'une protéine, donne une coloration violette (un volume d'une solution de protéine — un volume d'acide glyoxylique en solution à 2 % et un volume de SO^4H^2).

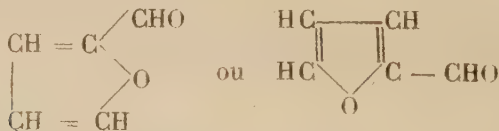
Cette réaction est due au groupe indol de la molécule protéique



On pratiquait autrefois cette réaction avec $\text{CH}^3 \text{COOH}$ qui contenait des traces de l'aldéhyde acide, car ce dernier est un produit d'oxydation de l'acide acétique et une de ses impuretés.

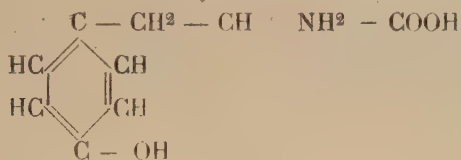
Réaction de Liebermann. — Un coagulum de protéine dissous dans HCL et chauffé dans ce dernier liquide donne une coloration violette puis brune.

L'aldéhyde, dérivé d'un sucre en C^5 et produit au dépens de l'hydrate de carbone de la protéine, se combine au noyau phénolique OH de la même molécule et donne cette réaction.



Le Furfurol ou aldéhyde pyromucique qui donne également coloration rouge violet avec isatine + SO^4H^2 (réaction commune avec le furfurane et le thiophène).

Réaction de Molisch. — Quelques gouttes d'une solution alcoolique de naphthol A, ajoutées à une solution de protéine en présence de SO^4H^2 (ajouté le premier) dans un tube à essai; il se forme à la surface de séparation un anneau violet, puis toute la masse supérieure est envahie par cette coloration



C'est encore ici, de l'aldéhyde formé ou furfureol produit par l'action de SO^4H^2 sur le pentane qui agit sur le groupement phénolique de la tyrosine. D'autres phénols, comme le thymol donnent une coloration rouge.

Réaction de Rohde. — *Zeitschrift für physiol. chem.*, (tome X), page 101, 1915.

Les protéines en solution ou en suspension dans de l'eau additionnée de certaines aldéhydes aromatiques puis de SO^4H^2 donnent des colorations diverses.

Avec le paranitro benzaldéhyde $\text{NO}^2\text{C}^6\text{H}^4 - \text{CHO}$, on a coloration verte très prononcée; avec vanilline, on a coloration rouge passant au violet; avec le paradi-méthylaminobenzaldéhyde, on a coloration violet-rouge passant au violet foncé; on ajoute 5 à 6 gouttes de solution à 5 % de l'aldéhyde, on acidule avec SO^4H^2 à 10 % jusqu'à apparition de la coloration violette. la caséine donne cette coloration. Les protéines ne contenant pas le noyau indol ne donnent pas cette réaction.

Réaction de Heller. — L'acide nitrique fort et contenant des vapeurs nitreuses donne au contact d'une solution de protéine, lorsque le contact s'opère en faisant suivre lentement dans un tube ou un récipient le trajet au liquide protéique pour qu'il ne se mélange pas au liquide acide plus dense, un anneau blanc proportionnel à la quantité de protéines dissoutes.

Réaction Xanthoprotéique. — L'acide nitrique à froid et mieux à chaud produit sur les groupes aromatiques des protéines, une coloration jaune serin, cette coloration jaune varie sous l'influence de NaOH ou d'un alcali, elle devient jaune orangé.

Réaction de Steensma. — *Zeitschr. physiol. chem.*, XLVII, page 27, 1905.

Steensma modifie la réaction précitée de Rohde, avec le paranitro benzaldéhyde. Si on fait bouillir une solution de protéine avec cet aldéhyde en poudre + Hcl, on a coloration verte qui, par addition de nitrite de sodium à 0,5 %, se transforme en bleu foncé.

Réaction de Milon. — On a un précipité blanc qui se produit lorsqu'on verse une solution de nitrate acide de mercure dans une solution de protéine.

Mercure, 1 partie

NO³H de densité 1,42, 20 parties.

Après dissolution totale du mercure on ajoute deux volumes d'eau et on décante. La réaction de Milon ne se produit nettement que dans les solutions de protéine qui ne contiennent pas d'éléments métalliques. Ce précipité blanc se transforme en une coloration rouge, lentement à froid, rapidement par la chaleur.

Cette coloration rouge est caractéristique du groupement phénolique de la protéine. La tyrosine qui contient ce groupement est caractérisée par cette réaction.

Réaction de la Triformoxine. — LERVIN, *Rép. de pharmacie*, 1913, page 26.

Les albuminoïdes, en général, donnent avec solution de 0,10 à 0,15 de triformoxine dans 100 gr. de SO^4H^2 à 66, une coloration violette persistante.

Nota. — Le plus possible, nous avons effectué nos dosages sur des laits frais. Cependant, pour serier nos observations, nous avons fait l'emploi de réactifs conservateurs, tels que le formaldéhyde, le bi-chlorure de mercure, le phénol. Nous devons dire que l'addition de 5 à 10 gouttes de formol pour un litre de lait, nous permettait de conserver ce dernier très facilement plusieurs jours, le temps nécessaire pour les réactions et les dosages de nos différents réactifs avec les mêmes laits.

I. — REACTIF D'ALMEN

Ce réactif est une dissolution de tanin acétique faite avec :

Tanin	4 grammes
Alcool à 45°.....	190 cc.
Ac. acétique cristallisé...	2 cc.

Le précipité produit en versant 10 cc. de lait, vivement agité au préalable, dans 10 cc. de réactif, se produit très facilement et se prête également à une bonne et rapide filtration. Le filtrat a une légère coloration jaunâtre due à la dissolution tanique. Il ne donne,

pour les laits frais, ni la réaction de Heller, ni glyoxylique, ni de Molisch. Les réaction du Bjuret et de Milon, ne peuvent s'y produire avec précision, car nous avons ici affaire à un poly-phénol qui donne des réactions avec le réactif de Milon et fournit très facilement une combinaison mercurielle brônâtre.

La réaction du formaldéhyde, sur les laits ainsi étudiés à l'état frais, sans aucune addition au préalable d'antiseptique a été établie pour chaque lait, concurremment au dosage de l'azote total, pour bien démontrer, dans une étude ultérieure, que dans l'état actuel de la connaissance des protéines, cette méthode de dosage ne serait pas plus précise que les autres.

Cette réaction générale du formol sera étudiée dans un chapitre spécial (1). Les filtrats du réactif d'Almen, évaporés au bain-marie, jusqu'à réduction à quelques cc., et traités par quelques cc. d'un mélange alcool-éther fournissent un précipité cristallin qui nous a permis au microscope de caractériser des cristaux rhomboédriques dégageant une odeur de méthylamine lorsqu'ils sont chauffés avec de la baryte. Ajoutons que le réactif d'Almen, pour l'étude comparative ultérieure, contient 3 éléments précipitant les protéines. Un seul corps tenant lieu de sel, dans l'espèce un phénol, le tanin qui précipite les albumines, un acide organique, l'acide acétique, qui est le réactif de choix pour la précipitation de la caséine, et l'alcool éthylique qui précipite également les protéines.

Une solution alcoolique de tanin ne pourra précipiter complètement les protéines du lait.

(1) Page 65.

De même l'alcool éthylique, depuis l'alcool absolu jusqu'à celui fortement dilué, ne précipite pas complètement les protéines. Ce mélange du réactif d'Almen, ayant pas conséquent un sel et un acide, avec un élément comme l'alcool, formera un mélange optima, pour la précipitation des protéines. Les lamelles sur lesquelles on a ajouté le précipité cristallin obtenu par l'alcool éther, et traité par l'acide sulfurique étendu laisse voir des sulfates d'Amino-Acides en longues aiguilles qui, soumises à l'action de la chaleur, se transforment en hexagones très réguliers.

1^{re} Série d'Expériences

Valeur azotée des Filtrats du réactif d'Almon

N° des laits.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cc/ de 0 NAOH N/10.....	0,6	0,8	0,5	0,5	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7	0,05
Valeur en Azote en mmgr.....	0,084	0,118	0,70	0,70	0,998	0,99	0,84	0,84	0,98	0,70

(moyenne par litre 0,89 mmgr.)

2^e Série d'Expériences

N° des laits.....	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
cc/ de NAOH N/10.....	0,8	0,8	0,07	0,7	0,8	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
Valeur en Azote en mmgr.....	0,112	0,112	0,98	0,98	0,112	0,84	0,98	0,98	0,98	0,98

(moyenne par litre, 0,100)

3^e Série d'Expériences

N° des laits.....	1	2	3	4	5
Az. trouvé avec réact/ simple.....	0,8	0,7	0,7	0,65	0,8
réact/ addit/ de 1 cc de : ac/ acétique.....	1 c/c	3/4 c/c	3/4 c/c	1 c/c	1 c/c

moyenne en mmgr. d'azote par litre, 102,2 mmgr.

moyenne en mmgr. d'azote par litre, 0,165 mmgr. 2

II. — REACTIF DE BRUCKE

C'est une solution aqueuse d'iodure double, de mercure et de potassium (1).

On met, dans un litre d'eau, 100 grammes d'iodure de potassium, on chauffe au bain-marie et on y dissout de l'iodure mercurique jusqu'à refus. On laisse refroidir et on filtre pour séparer le précipité rouge d'iodure mercurique formé pendant le refroidissement. A la liqueur filtrée, on ajoute 1 à 2 grammes d'iodure de potassium.

On peut également faire une solution saturée de chlorure mercurique, dans laquelle on verse une solution saturée d'iodure de potassium; le précipité d'iodure mercurique produit est solubilisé en ajoutant une solution d'iodure de potassium goutte à goutte jusqu'à dissolution complète du précipité rouge.

Ce sel double, en solution constituerait à lui seul un très mauvais réactif pour précipiter les protéines du lait. Il lui faut un adjuvant acide, $\text{HCL SO}^4 \text{H}^2$, ou même simplement un acide organique, comme l'acide acétique. Ajouté sans acide au lait, il se forme une bouillie qu'il est impossible de filtrer. A ce magma, l'addition de quelques gouttes d'un des acides précités produit un coagulum dont le filtrat est très clair, et ne contient pas de protéines; toutes les réactions des protéines sont négatives.

L'azote total dosé dans les filtrats est d'autant plus abondant qu'il y a davantage d'acide, et surtout d'acide minéral. Cet azote peut varier du simple au double. Le réactif de Brucke, non suffisamment acidifié, laisse

(1) *Wiener Akad.*, II, 53, 1871.

dans le filtrat une protéine qui donne les réactions du Biuret, Xanthoprotéique mais non de Millon. Ce même réactif acidifié avec l'acide acétique, sans en ajouter assez pour précipiter toutes les protéines, contient dans son filtrat une protéine donnant la réaction de Milon.

[illegible]

Si nous examinons ces différents tableaux, nous voyons que l'acide sulfurique donne des résultats supérieurs, en valeur d'azote total, que les acides chlorhydrique et acétique. Par l'addition au réactif fondamental d'une quantité plus grande d'acide minéral ou organique, l'azote total augmente. Le Kjeldahl de ces filtrats est aisé à effectuer en ce qu'ils contiennent du mercure.

III. — ETUDE DU REACTIF DE TANRET

Ce réactif se prépare en ajoutant à 20 cc. d'acide acétique cristallisable, 3 grammes 32 d'iodure de potassium, et 1 gramme 35 de bi-chlorure de mercure. On ajoute quantité suffisante d'eau pour faire 60 cc. Le filtrat des précipités du réactif Tanret est légèrement jaunâtre, mais il est très clair et ne donne pas les réactions différentes des protéines.

N° des laits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N. par L. de lait	0,140	0,98	0,98	0,140	0,98	0,126	0,140	0,126	0,112	0,98	0,98
moyenne pour 10 laits, 0,116 mmgr. 6 p. litre)											

Nous voyons, d'après ce tableau, que le réactif de Tanret a, à quelques milligr. près, la même valeur que le réactif d'Almen pour la teneur en azote non protéique, la moyenne correspond à peu près à celle du réactif de Brucke acétique.

IV. — REACTIF DE DENIGES AU SULFATE MERCURIQUE

Le réactif de Denigès, sans addition d'un acide minéral ou organique, produit un précipité avec le lait, mais ce précipité n'a pas de cohésion pour la filtration qui en est difficile. Dans ce filtrat, nous avons les réac-

tions de Heller xanthoprotéique, Biuret et Milon positives.

Formule du réactif. — Oxyde mercurique jaune ou rouge 50
Acide sulfurique pur 200
Eau distillée 1000

Ce réactif ne sert pas à précipiter les protéines du lait, mais nous avons tenu à l'étudier comme type de sels mercuriels agissant sur le lait.

Nous voyons, d'après sa formule, que l'acide par rapport au sel, a une valeur très grande. La charge métallique n'est pas suffisante pour assurer une bonne précipitation.

10 laits.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
acidifié avec 1 cc	0,11	0,154	0,14	0,126	0,182	0,154	0,168	0,168	0,14	0,154
SO ⁴ H ²	(moyenne pour les 10 laits 0,150 mmgr. p. litre)									

Insuffisamment acidifié par un acide fort, ce réactif laisse dans son filtrat une protéine donnant les réactions de l'albumine et non de la caséine (Réaction de Milon négative). De même, une quantité insuffisante d'acide acétique ajoutée à ce réactif donne un filtrat qui contient une protéine donnant la réaction de Milon.

Nous voyons, d'après ce tableau, que la valeur de ce réactif, en azote total, est, à peu de chose près, celle du réactif d'Almen et de Tanret.

Nous avons pu constater que dans les filtrats de ce réactif auquel n'était pas ajoutée une quantité suffisante d'acide minéral ou organique, restait..... de l'azote protéique en grande quantité. Cette constatation a été effectuée par l'action du réactif phospho-

tungstique dans ce milieu débarrassé de mercure par H_2S . De même, le réactif de Tanret et le réactif d'Almen, produisaient un précipité. Le précipité du réactif phosphotungstique, agissant dans ce milieu a été traité par la baryte jusqu'à réaction alcaline. La solution a été ensuite traitée par un courant d'acide carbonique, le précipité de carbonate de baryte laissé sur un filtre on a examiné dans la solution les différentes réactions des protéines.

V. — REACTIF DE MAYER

La liqueur obtenue par l'iodure mercurique en excès laissé au contact de 10 parties d'iodure de potassium dissous dans 100 parties d'eau, donne des précipités peu homogènes avec les matières protéiques. L'addition d'un acide minéral ou organique, favorise la précipitation qui peut devenir complète, pour une dose suffisante d'acide.

On peut remplacer ce réactif (de Boullay et de Valsér) par 13 gr. 546 de chlorure mercurique et 49 gr. d'iodure de potassium dans un litre d'eau (Mayer).

N° des laits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Réact/ sans ad/ d'acide traité par le phosphotungstiq/	0,98	0,98	0,16	0,98	0,70	0,84	0,112	0,84	0,84	0,98	0,98	0,112
	(moyenne 112 milligrammes de N proteique)											
Réactif + 1 cc												
de $SOH^1 H^2$	0,154	0,168	0,154	0,126	0,112	0,168	0,154	0,168	0,182	0,140	0,140	0,126
	(moyenne pour 10 laits, 0,151 mmgr. p. litre)											

Le réactif de Mayer non acidifié laisse passer, ainsi qu'en témoigne précisément le tableau des différents essais et dosages, dans son filtrat une quantité très grande d'azote protéique (trouvé 112 milligr. d'azote

protéique resté en solution) additionné d'un acide minéral, il devient un excellent réactif analogue en valeur de l'azote non protéique aux réactifs de Brucke et de Denigès traités dans les mêmes conditions. Il est légèrement supérieur au réactif de Tanret et d'Almen, car ces derniers ne contiennent qu'un acide organique, et cela dans des proportions plus faibles.

VI. — ACIDE TRICHLORACÉTIQUE

L'acide trichloracétique est de l'acide acétique dont les trois hydrogènes du premier groupe hydro-carboné ont été remplacés par trois atômes de chlore.

Employé seul, ce réactif ne précipite pas complètement les protéines du lait. Les filtrats donnent la réaction violette du Biuret; les réactions xanthoprotéiques et de Heller. Il peut avoir le même pouvoir précipitant que son générateur l'acide acétique, mais il lui faut aussi un adjuvant acide pour qu'il parachève son rôle de précipitant.

Le raisonnement qu'on peut suivre avec ce réactif est le même que pour les réactifs précités.

its.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
loracétique										
de SOH H ²	0,14	0,14	0,154	0,14	0,126	0,126	0,154	0,126	0,154	0,126
	(moyenne pour 10 laits, 0,140 mmgr p. litre).									

VII. — REACTIF SILICOTUNGSTIQUE

Préparation de l'Acide silicotungstique
(procédé Copaux).

On commence par préparer de la silice gélatineuse en ajoutant a du silicate de soude du commerce,

(1) *Fraenkel Pflügers Arch.*, LII, 128.

moyennement étendu, de l'acide azotique jusqu'à réaction acide au tournesol.

D'autre part, on dissout du tungstate de soude du commerce dans 5 fois son poids d'eau H_2O , puis on acidule avec précaution à froid par NO_3H , jusqu'à ce que le précipité d'abord formé ne se dissolve plus que lentement. A ce liquide, on ajoute la silice délayée dans son eau mère, de façon qu'il en reste un excès indissous, puis on porte au bain-marie bouillant. A mesure que la température s'élève, l'acide tungstique subit une condensation moléculaire, libère une partie de l'alcali qu'il saturait primitivement, et si la liqueur n'avait au début qu'une légère acidité, on la voit prendre une réaction alcaline. On additionne le milieu d'acide azotique jusqu'à réaction acide. Après 40 à 45 minutes, on essaie si HCl produit un précipité. Si oui, on continue à chauffer jusqu'à ce que cessé la précipitation, alors la combinaison est formée et reste en dissolution on filtre, le filtrat légèrement nitrique est refroidi et placé dans une boule à décantation avec de l'éther puis de l'acide sulfurique au tiers jusqu'à trouble par agitation et scission en trois couches. La couche inférieure est une combinaison d'éther et d'acide silicotungstique. Lorsqu'elle est éclaircie par repos, on décante dans un ballon, on y fait passer un courant de vapeur d'eau, l'éther s'élimine, il reste une solution concentrée d'acide silicotungstique qu'on peut utiliser directement, ou transformer en son sel potassique et faire cristalliser.

5 grammes de cet acide sont solubilisés dans 100 cc. d'eau distillée (Codex, p. 852). On emploie 10 cc. de ce réactif additionnés de quelques gouttes d'acide acé-

tique. Ce modus faciendi est adopté par Gabriel Bertrand et Bouin, professeur à la Faculté des Sciences de Nancy, pour précipiter les protéines du lait de vache. Ce réactif a le grand avantage de précipiter complètement les protéines du lait et d'avoir un filtrat très peu acide qui se prêterait parfaitement au dosage du lactose. Pour le cas qui nous intéresse nous pourrions voir que son filtrat contient beaucoup moins de N non protéique que les autres réactifs.

A la molécule complexe qui le constitue semble adhérer par un phénomène de teinture plus prononcé, le N non protéique. Ce phénomène de teinture fut déjà remarqué dans la précipitation des protéines par certains réactifs. Labbé et Bith ont montré une perte de 25 % d'Amino-Acides perdus dans la trame des protéines (1).

1^{re} Série d'Expériences

Filtrats.....	0,042	0,028	0,042	0,042	0,042	0,042	0,056	0,056	0,042	0,056
.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	(moyenne pour 10 laits, 0,0406 mmgr 4 p. litre)									

2^e Série d'Expériences

des laits.....	1	2	3
azote des filtrats	0,019	0,028	0,049
	(moyenne pour 3 laits, 0,042 mmgr. p. litre)		

VIII. ETUDE DU REACTIF PHOSPHOTUNGSTIQUE

Un excès de réactif phosphotungstique ajouté aux filtrats des différents réactifs étudiés, pour l'évaluation de leur teneur en azote, est un procédé défectueux, car il gêne considérablement pour opérer les Kjeldahl, forme un dépôt insoluble, et amenant facile-

(1) Soc. de Biologie, 15 nov. — sqq. — 1913.

ment la rupture des ballons. Il vaut mieux, et c'est le procédé que nous avons adopté, verser, avec une burette de Gay-Lussac, une solution faite avec :

Acide phosphorique pur.....	10 gr.
Tungstate de soude	20 gr.
Eau (q. s.) pour 100 cc.....	

Faire bouillir une heure, en remplaçant par de l'eau distillée celle qui s'évapore, filtrer, ajouter à 100 cc. de réactif de 5 à 7 cc. de $\text{SO}_4 \text{H}_2$.

Le réactif phosphotungstique a été adopté, pour la précipitation des protéines, en raison de la facilité de filtration de ces précipités, de la clarté de ces filtrats et de la constance de la valeur de ces derniers en azote non protéique. Il était du reste indiqué dans les ouvrages de biologie qui traitaient de la désintégration ou de l'hydrolise des protéines. Employé avec succès, notamment par Hugoumenq et Morel dans leurs travaux sur les dérivés protéiques, il isole par son excès d'acidité et sa molécule de métal lourd, facilement les matières protéiques.

Les peptones, les peptides, et certains Amino-Acides à deux groupes de NH_2 , sont précipités par lui, mais cette perfection va-t-elle jusqu'à éliminer d'un milieu tous les produits de transformation, sauf les Amino-Acides ? Nos expériences prouveront que cette perfection est limitée, et que son pouvoir de précipitation ne va plus loin que certains peptides.

Levene et Beatty (1) ont montré que le Glycocolle et l'Alanine à 10 % étaient précipités par le réactif phosphotungstique. La Leucine à 10 % également; le

(1) *Zeit phys. chem.* 1906. Vol. 47, fasc. 2 et 3, pp. 149-51.

précipité à l'aspect huileux. L'acide glutamique à 10 % est précipité, mais soluble dans un excès de réactif.

Dans un liquide d'hydrolyse où on a versé le phosphotungstique toutes les protéines et la plupart des peptides ont été précipités. Mais on a dans le magma sirupeux obtenu par l'évaporation classique indiquée et duquel on décollera les Amino-Acides par la méthode d'éthérification de Fischer, une quantité très grande de produits inconnus. Malgré ses imperfections, il semble être le réactif le plus employé à l'heure actuelle pour précipiter les protéines, mais dans le lait, notamment, où se trouvent des édifices chimiques délicats, nous verrons qu'il vaut mieux employer d'autres procédés pour la captation de l'azote non protéique.

1^{re} Série d'Expérience

s laits.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
des filtrats.....	0,210	0,168	0,182	0,182	0,168	0,14	0,14	0,162	0,210	0,14
(moyenne pour 10 laits, 0,172 mmgr. p. litre).										

2^e Série d'Expérience

s laits.....	1	2	3	4	5
des filtrats... ..	0,112	0,168	0,129	0,140	0,131
(moyenne des 5 laits, 136 mmgr. p. litre).					
de gazométrique...	0,12	0,17	0,14	0,14	0,13
(moyenne des 5 laits, 0,140 mmgr. p. litre).					

**ETUDE DU REACTIF AU METAPHOSPHATE
DE SOUDE**

La solution de métaphosphate de soude a été préconisée par Denigès pour précipiter les protéines du lait. Ces mêmes solutions ont été employées pour précipi-

(1) *Chimie Analytique*, p. 68.

ter les protéines du sang par Delaunay (déjà cité) pour doser ultérieurement les Amino-Acides.

Les mêmes considérations au sujet de ce réactif, comme pour les autres qui ont été étudiés, sont à mentionner. Toutefois, nous avons pu remarquer la facilité de filtration et de centrifugation produites par l'action de ce réactif sur le lait; nous avons employé la solution à 5 % de métaphosphate de soude, dont on prenait 10 cc. pour ajouter à 10 cc. de lait, on additionnait le tout de deux gouttes d'acide chlorhydrique ou d'acide acétique; voici le résultat de trois expériences.

N° des laits.....	1	2	3
Valeur azotée des filtrats	0,126 mmgr.	0,140 mmgr.	0,154 mmgr.
	(moyenne pour les 3 laits : 0,140 mmgr.)		

IX. — ETUDE DE L'ALCOOL ACETIQUE

L'alcool étant un réactif précipitant des protéines, de même que l'acide acétique, nous avons cherché à connaître qu'elle était la valeur du filtrat de ce réactif en azote non protéique. L'alcool acétique faible a été employé, mais nous avons vu que les filtrats contenaient des protéines (réaction du groupe tyrosine et du Biuret). Nous avons essayé surtout l'alcool à 65° acidifié avec de l'acide acétique cristallisable à 1 o/oo. Ce procédé, du reste, a été préconisé par Bordas et Toupin pour éliminer les protéines du lait, et par Bordas et Raczkowsky qui éliminaient ultérieurement du précipité caséine beurre, une substance azotée complexe, la Lécithine, Malenfant et d'autres chimistes s'étant occupés de la question des laits l'ont employé avec succès.

Alcool acétique à 65 à 1 0 00 d'acide acétique. —

Dans 25 cc. de cet alcool à 65° acétique on verse goutte à goutte 10 cc. de lait frais, on centrifuge et on dose dans les filtrats l'azote non protéique. La centrifugation donne un liquide exempt de protéine (réaction négative). Il en est de même pour les liquides de filtration, mais dans ce liquide de filtration se forme, au bout de quelques jours, un léger précipité floconneux que l'on est obligé de refiltrer. Ce léger précipité isolé nous a permis de reconnaître des corps donnant la réaction bleue du Biuret et des cristaux de Tyrosine.

its.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
filtrats.....	0,238	0,280	0,245	0,230	0,252			0,245		
	(moyenne pour 10 laits, 0,2566 mmgr. p. litre).									

Le tableau ci-dessus montre la supériorité de l'alcool acétique sur les autres réactifs pour la captation de l'azote non protéique.

Les lamelles, sur lesquelles on a déposé quelques gouttes de l'alcool acétique laissent voir de nombreuses cristallisations. Si l'on ajoute au résidu de l'évaporation de quelques cc. de cet alcool acétique un peu de baryte et que l'on chauffe, on perçoit, très nettement, une odeur de méthylamine.

Nous avons ainsi choisi les principaux réactifs connus des protéines, laissant de côté ceux contenant de l'azote, tels que le réactif de Patein, le nitro molybdique, le ferro cyanure de potassium, le citro et l'acéto picrique ou d'Esbach, réactifs qui sont, d'après les renseignements fournis, de bons réactifs précipitant les protéines, mais dont nous ne pouvions nous servir. Tous les réactifs ainsi employés sont des mélanges plus ou moins heureux de sels et d'acides qui préci-

pitent d'autant mieux les protéines que leur pouvoir électif, pour ces corps complexes, est plus grand. De cette étude de la valeur azotée des filtrats de ces précipités, il se dégage :

Qu'une solution saline neutre ne peut précipiter complètement les protéines du lait; qu'un acide seul ne peut également isoler totalement les protéines; que l'addition d'un acide à un sel, dans de bonnes conditions, peut parfaire la précipitation des albuminoïdes; que l'acide sulfurique a un pouvoir dissolvant de l'azote total non protéique plus fort que celui des autres acides employés; que les différents réactifs métalliques auxquels on a ajouté la même quantité d'acide sulfurique, pour fournir une bonne précipitation, sont à peu près équivalents, à quelques milligrammes près, comme séparants de l'azote non protéique; que le réactif d'Almen, de Tanret, ainsi que les réactifs acidifiés de Denigès, Brucke, Mayer, trichloracétique, méta-phosphate de soude et silico-tungstique, sont d'excellents réactifs (le phosphotungstique également, mais ce réactif, par la quantité assez grande d'acide sulfurique qu'il contient, décèle une plus grande quantité d'azote non protéique).

Enfin, l'alcool à 65° acidifié devient pour l'étude que nous nous sommes proposée le réactif de choix.

III. — Après l'étude générale de ces divers réactifs on peut formuler les observations suivantes :

1° Pour la précipitation des protéines. — Les plus mauvais réactifs non acidifiés, tels que ceux de Brucke, Mayer, arrivent à bien précipiter les protéines lorsqu'on leur ajoute quelques gouttes d'un acide soit mi-

néral, soit organique. Un filtrat du réactif de Brucke non acidifié et qui donne la réaction du Biuret, violette, lorsqu'on a isolé cette protéine avec le réactif phosphotungstique, voit disparaître cette réaction de son milieu dès qu'on ajoute au sein du mélange quelques gouttes d'acide acétique, ou sulfurique, ou chlorhydrique. Les meilleurs réactifs précipitant les protéines du lait sont les réactifs phosphotungstique et silicotungstique; ils donnent quelquefois, en effet, au sein des filtrats des autres réactifs des précipitations plus ou moins abondantes si ces filtrats contiennent, outre les matières azotées non protéiques connues (Amino-Acides, uréides, dérivés xanthiques), différents éléments trouvés dans quelques laits, éléments que l'on peut identifier à des peptides plus ou moins complexes et donnant la réaction bleue du Biuret. Ces éléments se retrouvent facilement par auto-précipitation dans les filtrats de l'alcool acétique non soumis à la centrifugation. Ces principes, isolés sur un filtre et desséchés, répandent une odeur aminée à la calcination, ils ne donnent pas la réaction des protéines ni des peptones et n'ont pas de cristallisation. Ils apparaissent au microscope comme une trame plus ou moins enchevêtrée avec des granulations isolées ou réunies en amas.

Aspect des différents filtrats. — D'une façon générale on peut dire que les différents réactifs décrits et étudiés ont des filtrats limpides. Seule varie leur coloration qui gêne considérablement pour la précision des réactions principales. Il est bien évident que la complexité chimique et la coloration de ces réactifs

empêchera de pratiquer, chez presque tous d'emblée, les réaction du Biuret, xanthoprotéique, Molisch et les autres principales réactions des matières protéiques. Pour effectuer la réaction des protéines dans ces différents milieux on isole les protéines, les peptones ou les peptides par le réactif phosphotungstique, universellement apprécié dans l'étude générale des protéines. Le précipité est isolé sur un filtre, lavé avec de l'eau sulfurique à 5 %. Ensuite, selon l'opération de Kossel et Kutscher (1), le précipité est broyé avec de la baryte, épuisé à l'eau distillée. La solution filtrée et soumise à l'action de CO_2 au bain-marie est évaporée et on opère sur le résidu ou sur la solution les réactions inhérentes aux protéines.

Réactions colorées générales. — Sur les réactifs d'Almen, de Tanret, de Brucke, de Denigès, on ne peut pratiquer la réaction de Heller. La réaction du Biuret n'est pas à essayer directement, car Albert Morel a montré que les Amino-Acides et les peptides en présence d'hydrates de carbone peuvent donner en présence d'un alcali comme la potasse et la soude une coloration rosée qui pourrait la faire confondre avec celle du Biuret, surtout après avoir ajouté à la solution une ou deux gouttes de liqueur cuivrique. Il est donc indispensable, dans les laits surtout, d'opérer toujours dans les conditions énoncées plus haut, c'est-à-dire faire la précipitation des principes qui donnent la réaction du Biuret, les isoler et les caractériser.

Le réactif phosphotungstique a lui-même une colo-

(1) *Zeit phys. chem.*, t. XXXI, p. 165.

ration violette qui empêche toute réaction de coloration et surtout la réaction du Biuret avec qui elle se confond.

La réaction de peptides qui donnent la réaction du Biuret, et que nous avons pu caractériser dans les vieux laits soumis à l'action de ce réactif, pourrait prêter à une grande confusion si l'on opérait directement.

Quelques filtrats de ces différents réactifs présentent, lorsqu'on a saturé leur acidité par une solution de carbonate de sodium, et versé dans le milieu une solution à 25 % d'acétate de mercure, isolé le précipité formé qu'on traite par H^2S , séparé le sulfure de mercure, évaporé doucement au bain-marie la solution obtenue jusqu'à résidu presque sec, des cristallisations différentes où on reconnaît le rhomboëdre et l'hexagone du Glycocolle, les sphérules de la Leucine quelquefois, très rarement les houppes de la Tyrosine, si ce n'est dans le traitement du lait par l'alcool acétique. A mesure que le liquide alcoolique est évaporé se déposent quelquefois très facilement des cristaux en fines aiguilles et en houppes de Tyrosine.

Les résidus ainsi obtenus contractent combinaison avec l'hydrate de cuivre pour donner de belles aiguilles bleues, de même avec l'oxyde de zinc on obtient de jolies tablettes quadrangulaires. Ces résidus mis en suspension dans l'alcool à 98°, dans lequel on fait passer Hcl gazeux desséché, donnent, dans un mélange réfrigérant, de longues aiguilles de chlorhydrate d'éther éthylique que nous identifierons plus tard, par la méthode de Fischer, au Glycocolle. La présence de Tyrosine, dans les filtrats de l'alcool acétique

seulement, les opérations ayant été faites sur les mêmes laits, tendrait à démontrer que ce réactif capte mieux les Amino-Acides que le réactif phosphotungstique. Un phénomène de teinture a laissé cet Amino-Acide moins soluble dans la trame des protéines englobées par le réactif métallique. Nous avons essayé également l'addition du lait goutte à goutte au réactif et nous n'avons pas eu dans le filtrat la réaction de la Tyrosine, positive dans l'alcool acétique. Il en résulte évidemment que les réactifs métalliques gênent la solubilisation de ces éléments.

Ces différents réactifs nous ayant donné un filtrat dont le résidu présentait quelques réactions typiques d'Amino-Acides nous nous sommes demandé si l'on ne pouvait effectuer dans ces milieux la réaction du formol sur les Amino-Acides. Cette réaction n'a pas donné de résultats. Il sera donné des détails sur cette anomalie lors de l'étude de l'action du formol sur le lait de vache (1).

Valeur de précipitation des divers réactifs. — L'étude de la valeur de précipitation de ces réactifs a des indications très intéressantes.

On obtient avec ces différents réactifs des précipités plus ou moins abondants, plus ou moins volumineux, selon le réactif considéré. Tantôt le précipité est formé par un bloc s'amassant rapidement au fond du récipient (ceci se remarque pour les réactifs à sels lourds, le réactif de Tanret, de Brucke, de Denigès et le phosphotungstique, silicotungstique). Tantôt les

(1) Action du Formol sur le lait de vache, p. 92,

précipités sont plus grenus et moins abondants (Almen, trichloracétique et métaphosphate de soude). Les deux meilleurs pour la précipitation des protéines sont le phosphotungstique et le silicotungstique. Ces remarques ont été effectuées avec des laits frais auxquels nous avons ajouté des peptones commerciales et avec des vieux laits dont nous donnerons les résultats expérimentaux.

On doit dire avant toute chose que nous n'avons trouvé dans les laits frais la réaction de peptides abiurétiques dans les filtrats des réactifs métalliques appelés ainsi parce qu'ils donnent la réaction bleue du biuret. Nous avons signalé plus haut la présence de ces précipités blanchâtres qui se forment tout seuls dans les filtrats de certains laits frais soumis à l'action de l'alcool acétique et qui isolés fournissent toutes les réactions inhérentes aux peptides :

- 1° Réaction bleue du Biuret;
- 2° Odeur aminée au creuset;
- 3° Non cristallisation;
- 4° Précipitation par le réactif phosphotungstique dans une solution à 5 % de SO^4H^2 .

Ces corps là ne se retrouvent pas dans les autres réactifs car leur filtrat ne donne pas de précipitation avec le phosphotungstique. Nous avons eu deux laits où les réactifs d'Almen et à l'acide trichloracétique avaient leur filtrat précipité par le réactif phosphotungstique. Le précipité isolé a fourni la réaction des peptides abiurétiques. Nous avons ainsi été amenés à étudier d'une façon particulière les réactifs qui semblaient les meilleurs et ceux, du reste, qui avaient été choisis déjà comme les meilleurs déféquants.

Le réactif phosphotungstique, choisi depuis longtemps par l'école allemande pour la précipitation des protéines ou de leurs produits de transformation, est resté le réactif classique pour l'isolement des Amino-Acides (1) et (2).

Expériences avec les peptones ajoutées à des laits. -- Fischer, Fraenkel, Pick et Siegried ont montré (1) que les peptones n'étaient pas des individualités chimiques mais des mélanges de substances pour l'isolement desquelles on n'a pas encore (3) de méthodes précises.

Des peptones commerciales, ajoutées à des laits, sont totalement précipitées par les réactifs phosphotungstique et silicotungstique. On peut, en effet, caractériser dans les filtrats des précipités des réactifs d'Almen, de Brucke, de Tanret, de Denigès, trichloracétique, les réactions du Biuret. Cette réaction est obtenue par la réaction classique déjà indiquée, c'est-à-dire par acidification préalable du filtrat dilué avec SO_4H_2 à 5 % et précipitation des corps par le réactif phosphotungstique. Le précipité obtenu est traité par la Baryte. La Baryte est enlevée par CO_2 à l'ébullition et dans la solution on caractérise les peptones.

Il ne faut pas s'étonner de ce que le réactif phosphotungstique précipite dans la suite un corps qui a passé dans son filtrat primitif. Dans certains vieux laits, notamment, où nous l'avons fait agir, nous avons

(1) Loc. cit. *Zeit phys. chem.*, I, XXXI, p. 165.

(2) HOFMEISTER. *Zeit phys. chem.*, IV, 253. — GULÉWITCH. *Zeit phys. chem.*, XXVII, 178. — HUGONNEUQ et MOREL. *Bulletin Société chimique*, 1907, p. 154.

(3) *Zeit phys. chem.*, XXIV, p. 267.

trouvé des corps qui isolés et traités ensuite par le même réactif dans un milieu acidulé à 5 % ont donné une précipitation complète (le liquide résiduel évaporé ne donne aucun produit charbonnant).

Nous avons pu voir que dans l'action de l'acide sulfurique à froid sur les protéines du lait, il se forme des corps qui ont les réactions des peptides et qui échappent à l'action ultérieure du réactif phosphotungstique (1).

De même, avec les vieux laits, nous avons pu voir, qu'à l'exclusion de peptides biurétiques qu'il laissait passer pour les reprécipiter ensuite dans des conditions d'acidité suffisantes, il ne précipite pas les combinaisons ammoniacales.

Certaines expériences ont été faites à ce sujet. Voici celles effectuées sur les vieux laits par l'action du réactif phosphotungstique :

Examen de la Réaction du Biuret dans quelques vieux laits traités par le réactif phosphotungstique.

its.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
es peptides biuret-													
mois après.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
es peptides biuret-													
mois après.....	Nég.	Pos.	Nég.	Nég.	Pos.	Nég.	Nég.	Nég.	Pos.	Nég.	Nég.	Nég.	Posit.
es peptides au bout													
ois.....	Nég.		Nég.	Nég.		Nég.	Nég.	Nég.		Nég.	Nég.	Pos.	
es peptides au bout													
ois.....	Nég.			Nég.		Nég.	Nég.	Nég.		Nég.	Nég.		
es peptides au bout													
mois.....	Nég.		Pos.	Pos.		Nég.	Nég.	Nég.			Nég.	Nég.	
es peptides au bout													
mois.....	Nég.					Nég.	Nég.	Nég.		Nég.	Nég.		

(au bout de 13 mois, toutes les réactions positives)

On peut voir, d'après ce tableau, que le réactif phosphotungstique, considéré comme le meilleur réactif précipitant les protéines du lait, devient impuissant

(1) Action de SO_4H^2 sur le lait, page 83.

au bout de quelque temps à isoler les produits de transformation dénommés polypeptides biurétiques (1) qui ne sont pas des peptones car ils ne se précipitent plus par les réactifs qui caractérisent ces dérivés. Le perchlorure de fer, le ferrocyanure acétique, le sulfate d'ammoniaque neutre, acide et alcalin, iodo-ioduré, le réactif d'Almen, ne produisent aucun changement dans le milieu.

On ne peut les mettre en évidence directement dans les filtrats, par la réaction de Biuret, pour les raisons énoncées plus haut (3).

Mais on peut opérer de la façon suivante : Eliminer le réactif phosphotungstique par la Baryte. Filtrer, éliminer la Baryte par CO_2 à l'ébullition. Evaporer et sur le résidu essayer la réaction de ces peptides. Le réactif phosphotungstique précipite ces substances dans une solution sulfurique à 5 % ; en plus ils donnent très nettement la réaction du Biuret.

Valeur azotée totale des filtrats. — En ce qui nous concerne, on peut dire que la signification la plus précise est la valeur de l'azote total de ces différents filtrats. Nous avons déjà vu dans l'historique de la question que la portion soluble isolée du lait pouvait contenir, parmi les corps azotés, des Amino-Acides, des corps xanthiques, des uréides, des peptides, des composés sulfo-azotés, phospho-azotés, des produits ammoniacaux. On aurait donc toute une série de corps desquels il faudrait éliminer les Amino-Acides.

(1) FISCHER et ABDERHALDEN, XXXIX, 81, XL, 215.

(2) HUGOUNEUC et MOREL. *Bull. Soc. chim.*, 4^e série, 1, p. 133; 131, p. 56.

(3) Page 84.

Cette valeur azotée varie peu pour différents filtrats. A peu de chose près, les filtrats d'Almen, de Brucke, de Tanret, trichloracétique, Denigès, représentent la même valeur azotée totale. Pour le réactif phosphotungstique, il y a une légère augmentation. Quant à l'alcool acétique il est nettement supérieur aux autres, 0,25 de N par litre. Le réactif silicotungstique représente dans son filtrat 5 fois moins d'azote que l'alcool acétique, 0,04 à 0,05 par litre. Ce sont les deux réactifs extrêmes de l'échelle. L'alcool acétique représente donc pour nous le réactif le plus qualifié pour l'étude que nous nous sommes proposée. Du reste, la valeur respective de l'azote total de ces différents réactifs ne fait que nous confirmer les remarques d'ordre microchimiques que nous avons précédemment constatées.

Quelques-uns de ces réactifs nous avaient donné avec l'acétate de mercure en milieu alcalin des précipités plus ou moins abondants desquels nous avons isolé des résidus variant comme poids qui nous avaient fourni assez nettement les réactions des Amino-Acides. On ne peut également verser directement l'acétate de mercure dans le filtrat alcalinisé; il faut éliminer l'excès de réactif phosphotungstique par la Baryte, ou l'excès de mercure par H^2S . Ces différentes opérations d'élimination de réactif et la présence de sels dans ces filtrats de réactifs métalliques sont cause d'une perte considérable des Amino-Acides, ainsi qu'on pourra s'en rendre compte au dosage.

Nous avons, en effet, remarqué que le filtrat de l'alcool acétique donnait avec l'acétate de mercure un précipité beaucoup plus abondant. Le résidu du traitement par H^2S , si l'on a effectué l'opération d'élimina-

tion du liquide dans le vide, ne contient que des résidus organiques. Le résidu du même traitement, provenant de réactif métallique, contient des traces de chaux et de Baryte, et montre l'altération qu'a provoqué le réactif acide métallique sur les sels des protéines. Enfin l'alcool acétique donne pour ce résidu des résultats plus intéressants en valeur azotée, et on reconnaît quelquefois dans ce résidu, à côté du Glycolle, les sphérules de la Leucine et les fines aiguilles de la Tyrosine, avec d'autres cristallisations d'Amino-Acides qu'il faudra identifier.

Voici le tableau de la valeur azotée totale des filtrats des réactifs étudiés (moyenne de cette valeur) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nom des réactifs	Alcool acide à 65	Phospho	Denigès	Brucke	Mayer	Tauret	Trichler	Almen	Silico-t
Moyenne de l'azote non protéique par L	0,250	0,172	0,155	0,154	0,151	0,112	0,140	0,089	0,
<i>Azote total des 10 laits expérimentés avec ces réactifs</i>									
N° des laits	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Azote par litre	4g60	5g32	4g69	5g94	4g34	5g74	5g11	4g69	4g97
(moyenne d'azote pour les 10 laits : 4g98 6 par litre)									
Rélation de l'azote non protéique avec l'az/total	Alcool acide	Phospho	Denigès	Brucke	Mayer	Trichlor	Tauret	Almen	Silico-tur
	1/19,4	1/28,9	1/32,1	1/32,3	1/33	1/35,6	1/44	1/55	1

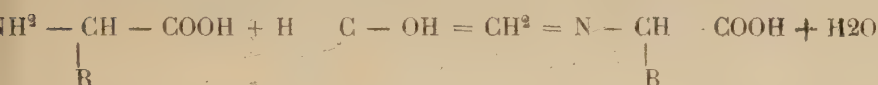
Action du Formaldéhyde sur le lait de vache. —

Il est permis de supposer que l'étude des Amino-Acides du lait de vache eût été plus approfondie si les chimistes n'avaient eu des échecs avec des procédés de dosage aisés et assez précis qu'ils essayèrent dans le lait sans succès, et qui, dans d'autres liquides physiologiques, leur avaient donné des résultats.

Quelle réaction plus facile et plus élégante, avec

des résultats satisfaisants publiés dans de nombreux mémoires ou périodiques de biologie, que celle du formol sur les Amino-Acides ? Réalisée avec un grand succès dans des liquides organiques, tels que le sang, l'urine, par Sorensen (1), Henriques (2), Delaunay (3), on l'a appliquée dans le lait non pas au dosage des Amino-Acides puisqu'elle ne réussit pas, mais au dosage des protéines.

Cette méthode est basée sur le fait que le formaldéhyde agissant sur un Amino-Acide ou sur le groupe NH^2 d'un peptide contracte combinaison avec la forme aminée de cet élément, crée une fonction méthylénique $\text{CH}^2 =$ La fonction aminée est bloquée, faisant place à une molécule d'azote isolée entre deux groupes hydrocarbures :



et le carboxyle apparaît par titrage avec alcali. Schiff Le premier a indiqué la valeur de la réaction (4). Cet auteur avait prouvé que les protéines possédant un chaînon NH^2 peuvent être considérées comme un vaste peptide, contractent combinaison avec le formol et que leur solution ou leur suspension devient acide après addition du Formaldéhyde. Obermayer et Wilhelm firent également les mêmes expériences (5). Après lui de nombreux auteurs, tant Allemands que

(1) *Biochem. Zeits*, 7, 4, 1907.

(2) *Zeit phy. chem.*, 64, 120, 1910.

(3) Thèse médecine Bordeaux, 1910.

(4) *Annal chem.*, 319 sq., 287, 1901; 325-348, 1902.

(5) *Biochem. Zeit.* XXXVIII, 1911.

Britanniques, ont proposé, avec des variantes plus ou moins rapprochées, des méthodes de dosage des protéines du lait par le formol. Les noms de Steinegger (1), Droop, Richmond (2), Schwartz (3), Graaff et Schaap (4), Walker (5), sont liés à cette très intéressante étude.

Partant du principe que le lait contient toujours les mêmes matières azotées tous ces auteurs arrivent avec des résultats plus ou moins proches les uns des autres, à établir qu'on peut doser les matières protéiques du lait de vache en multipliant par un facteur qui varie avec chaque auteur l'indice du Formaldéhyde sur le lait.

Voici le procédé de Steinegger (6) : Dans deux ballons on verse 100 cc. de lait, 1 cc. de phénolphtaléine en sol alcoolique à 1 % ; puis on verse de la soude 1/4 N jusqu'à coloration rose. L'autre portion de 100 cc. reçoit 5 cc. de formol à demi neutralisé et puis on verse de la soude 1/4 N jusqu'à coloration rose. La différence d'acidité des deux solutions exprime l'indice d'aldéhyde.

Droop Richmond (2) prétend que le procédé de Steinegger n'exige pas assez de formol. En plus, cet auteur préfère l'hydroxyde de strontiane N/14 à la soude.

Graaff et Schaap ont suivi la méthode de Richmond et ont examiné en plus l'influence de la dilution du

(1) *The Analyst.*, 31, 338, 1906 ; 33, 115, 1908 ; 36, 9, 1911.

(2) *Zeit. Untersuchung der Nahrungs und Genussmittel.* 459, 1905.

(3) *Zeit phys. chem.*, 31, 460, 1900.

(4) *Annales fals.*, 1913.

(5) *Journ. ind. Engl. chimest.*, 14, p. 131.

(6) *Loc. cit.*

formol. Leurs expériences ont démontré que dilué à 1/10^e le formol accusait la même acidité.

Leur procédé consiste à prendre 100 cc. de lait + 1 cc. de sol. alc. de phtaléine à 1 %. Neutraliser par soude à 1/4 N. Ajouter 10 cc. de formol 1/2 neutralisé et verser de nouveau de la soude à 1/4 N jusqu'à coloration rosée.

Voici la moyenne de 7 observations effectuées sur 100 cc. de lait par Graaff et Schaap :

Azote par Kjeldahl	0,5666
Indice d'aldéhyde	7,2924
Protéine (N × 6,37)	3,61

$$\frac{N}{I \cdot A} = \frac{0,5666}{7,2924} = 0,0777 \dots \quad \frac{P}{I \cdot A} = \frac{3,61}{7,2924} = 0,495$$

des laits.....	1	2	3	4	5	6	7
par Kjeldahl... ..	0,5449	0,615	0,5913	0,528	0,560	0,563	0,5675
ice d'aldhéhyde...	6,936	7,452	7,608	6,936	7,384	7,273	7,162
ière protéique....	3,47	3,89	3,77	3,77	3,62	3,59	7,355
lité.....	5,6	6,9	5,6	6,4	5,8	6,2	6,1

Observations faites par Steinegger pour 100 cc. de lait.
(Moyenne de 7 observations).

Azote par kjeldahl	0,5311
Indice d'aldéhyde	6,971

$$\text{protéine} = N \times 6,37 = 3,38 \quad \frac{N}{I \cdot A} = \frac{0,5311}{69,1} = 0,0762$$

$$\frac{\text{Poids de la protéine}}{\text{indice d'aldéhyde}} = \frac{3,38}{6,971} = 0,485$$

Observations de Droop Richmond.

N par kjeldall	0.5016
Indice d'aldéhyde	7 467
protéines	3.20

$$\frac{N}{I A} = \frac{0.5016}{7.467} = 0.0672$$

$$\frac{P}{I A} = \frac{3.20}{7.467} = 0.429$$

La méthode de Walker repose sur le même principe. A 10 cc. de lait on ajoute 1 cc. de phénolphtaléine à 1 % et une solution de soude N à 1/9 jusqu'à teinte rose. On ajoute alors environ 2 cc. de formol à 40 % neutralisé et on titre avec même solution de soude jusqu'à teinte rose. Le nombre de cc. employés dans ce deuxième dosage multiplié par le facteur 1,63 donne le pourcentage de caséine. Ces résultats concordent avec ceux des autres méthodes.

En d'autres termes 1 gr. de matière protéique exige 2 cc. 06 de soude pour Steineger, et 2 cc. 53 de soude 1/4 N pour Richmond et 2 cc. 02 pour Graaff et Schaap.

Echec du Formaldéhyde sur les Amino-Acides du lait. — La réaction du formol sur les Amino-Acides ayant joué un rôle important pour le dosage de ces derniers dans les liquides physiologiques, il était tout indiqué pour nous d'essayer cette réaction facile sur les filtrats des différents réactifs précipitants les protéines du lait, pour apprécier rapidement la valeur azotée des filtrats en Amino-Acides.

Nous avons effectué cette réaction sur tous les filtrats des différents réactifs : elle n'a donné aucun résultat. Frappé par cet insuccès, nous avons cherché

à nous rendre compte de cette anomalie, car nous le verrons, l'azote sous la forme d'Amino-Acide représente par litre plus d'un gramme de produit et 0,20 centigrammes d'azote. Nous devrions, par conséquent, sur chaque filtrat de 10 cc. de lait traité par le réactif décelant le plus d'azote sous la forme d'Amino-Acide, l'alcool acétique en l'espèce, avoir environ 1 cc. 4 de NaOH N/10 après l'addition du formol. Les autres filtrats devraient avoir une manifestation d'acidité moindre puisqu'il avait été reconnu que par un phénomène de teinture cet azote restait sur le précipité protéines beurre métal.

Voici les expériences effectuées sur 5 laits avec le réactif phosphotungstique, le métaphosphate de soude acidifié et l'alcool acétique.

5 laits.....	1	2	3	4	5	
ction du Formol sur rat de l'alcool acéti- vaporé et repris par	0	0	0	0	0	
ction du Formol sur at du phosphotungs-	0	0	0	0	0	
ction du Formol sur at du métaphosphate de.	0	0	0	0	0	
ction du Formol addition à 10 ccubes t de 10 ccubes d'une on de glycocolle à pour mille.	0.126	0.126	0.133	0.126	0.126	(avec alcool acétique).
	0.111	0.98	0.93	0.91	0.84	avec le réactif phospho- tungstique.
	0.91	0.84	0.91	0.91	0.91	avec le métaphosphate de soude.

On voit, par ces expériences faciles à réaliser, que si on ajoute à du lait un Amino-Acide, les filtrats des

différents réactifs étudiés qui n'accusaient auparavant aucune réaction du Formaldéhyde donnent après cette addition des manifestations d'acidité variables, et inhérentes au réactif considéré. La perte est très minime pour l'alcool acétique qui s'approche de la réaction théorique. Pour le réactif phosphotungstique, une certaine quantité d'azote est perdue par le même phénomène de teinture déjà étudié.

Nous avons eu également les mêmes échecs du Formaldéhyde dans les autres réactifs étudiés. Nous sommes donc en droit de supposer que l'Amino-Acide est sous une forme complexe ou à l'état de combinaison que les réactifs ne peuvent défaire.

2^e série d'expériences. — Si nous traitons du lait frais par du sulfate de magnésie, du phosphate de soude, du métaphosphate de soude, et si nous essayons la réaction du Formaldéhyde sur du lait traité par ces réactifs, la réaction est la même que sur du lait frais.

Si nous versons de l'acide phosphotungstique, de l'acétate de plomb ou de l'acétate de mercure dans le même lait et si nous essayons la même réaction du formol sur les laits traités par ces réactifs, nous n'avons plus ici la réussite de la réaction. Le métal a du cette fois contracter combinaison avec le carboxyle de la protéine qui ne peut plus apparaître au Formol.

Si nous isolons la protéine traitée par un réactif qui ne contracte pas combinaison avec elle, le métaphosphate de soude, par exemple, nous avons également sur le produit isolé la même manifestation d'acidité au formol. Cette expérience peut être effectuée dans le tube du centrifugeur où on isole la protéine du filtrat.

De ces quelques expériences il résulte que le formol paraît uniquement agir sur les protéines du lait qui, d'après les ouvrages classiques, seraient au nombre de 3, mais que certains auteurs très compétents, Fischer (1), Lindet et Ammam (2) n'admettent qu'au nombre de deux.

Et c'est par cette réaction du formol que les auteurs cités plus haut ont voulu doser les protéines du lait de vache.

Si le lait était toujours identique dans sa composition, en ce qui concerne les éléments azotés, le dosage préconisé par ces auteurs serait basé sur un principe très juste.

Le coefficient établi par eux et servant à multiplier le chiffre de l'acidité trouvée au formol, viendrait d'un azote total fourni par des groupes azotés toujours identiques. Mais si les protéines sont des substances chimiques définies comme les polypeptides les plus compliqués, le lait n'a-t-il que ses protéines comme éléments azotés. Le traitement du lait par l'alcool acétique nous montrera, qu'en fait d'azote non protéique, il varie dans sa composition bien qu'il garde un azote total toujours très voisin. Mais la portion non soluble a-t-elle toujours les mêmes groupements azotés ? La question n'est pas encore résolue. Mais le fait d'avoir trouvé des peptides dans les laits, des éléments azotés, tels que les nucléones étudiés par Wittmack (1), l'incertitude des auteurs les plus réputés pour la dualité

(1) Exposé de Fischer sur les travaux accomplis sur les protéines, *Journal de pharmacie et chimie*.

(2) *Revue générale du lait*, 1905, n° 16.

(3) Déjà cité.

ou plus des protéines, tout cela fait qu'il est permis de supposer que le lait peut varier dans sa constitution azotée.

Wroblewski (1) aurait trouvé dans le petit lait une substance nommée opalisine et qui ne précipite pas à l'ébullition. Elle n'est soluble que dans les solutions salines avec opalescence. On la prépare en précipitant la Caséine par l'acide acétique et en ajoutant dans la solution filtrée du sulfate d'ammoniaque.

Les travaux d'Hammarsten (2) ont mis en lumière que la Caséine est une substance bien définie, ayant toujours la même composition centesimale. Les produits de l'hydrolyse de cette protéine ont été étudiés par Skraup (3), Fischer (4), Hlasiwetz et Habermann (5).

On pourrait donc effectuer le dosage de cette protéine et des autres éléments azotés si ces éléments sont toujours les mêmes dans le lait.

Nous établirons par quelques expériences effectuées :

1° Que le rapport azote révélée par le formol, varie

$$\frac{\text{azote total}}$$

peu dans certains laits, ou qu'en d'autres termes on pourrait arriver à une évaluation approximative des protéines en tenant compte de ce rapport et en adoptant un coefficient multiplicateur de la manifestation d'acidité au formol.

(1) *Zeit phys. chem.*, XXIV.

(2) *Zeit phys. chem.*, VII, 224.

(3) *Zeit phys. chem.*, XLII, 274.

(4) *Zeit phys. chem.*, XXXIX, 155.

(5) *Annalen der chemie and pharmacie*, t. 169, pp. 30 et 157.

2° Que dans d'autres laits cette relation n'existe plus par le fait d'un indice d'aldéhyde moindre et d'un azote total élevé, ou d'un indice d'aldéhyde élevé et d'un azote total moindre.

1^{re} série d'expériences.

laits du	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
...	1cc7	1cc6	1cc3	1cc2	1cc2	1cc3	1cc4	1cc4	1cc5	1cc4	NAOH N/10
...	4.60	4.97	4.69	4.90	4.34	5.74	4.48	5.110	4.69	4.802	

2^e série d'expériences.

laits du	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
...	1cc6	1cc7	1cc8	1cc5	1cc4	1cc6	1cc4	1cc6	1cc6	1cc4	NAOH N/10
...	6.72	5.250	5.74	4.90	5.152	5.012	4.97	4.928	5.614	4.83	

Si nous faisons la moyenne des cc. de NaOH N/10 employés à la saturation des carboxyles, nous voyons que pour les 20 laits, nous avons le chiffre de 4 cc. 48, et si nous passons à l'examen de ces différents laits, nous voyons que, pour certains qui ont beaucoup d'azote total, nous avons une réaction du formol qui ne correspond pas du tout à une relation exacte.

3^e série d'expériences.

Laits ayant la même manifestation d'acidité au formol :					
s laits...	1	2	3	4	5
indice de formol 1cc5 NAOH N/10 pour tous les laits					
total par litre.....	4.94.2	4.22 8	5.51.6	4.60	3.441

1^{re} série d'expériences.

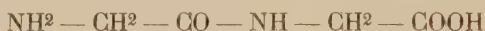
laits ayant une manifestation d'acidité en formol de 1cc				
s laits.....	1	2	3	4
al par L.....	4.27	4.34	4.73	4.83

Il faudrait donc, ainsi que nous l'avons déjà mentionné, admettre, en fait d'éléments azotés, un lait type où il y ait toujours les mêmes groupes, c'est-à-dire les mêmes protéines, ou les mêmes peptides, pour que ce procédé puisse avoir une garantie suffisante d'exactitude.

On peut, en effet, pour l'expérimentation effectuée, suivre le raisonnement théorique suivant :

Le Glycocolle $\text{CH}_2\text{—NH}_2\text{COOH}$ pour une molécule de N à un carboxyle. Théoriquement, 75 de substance donneront 14 grammes de N, on retrouvera le même dosage au Kjeldahl et à la titration au formol.

La glycyl-glycine a un seul carboxyle et deux molécules d'azote dont un est caché.



La réaction du formol donnera pour 132 de substance 0,14 de N. Le dosage de N total donnera pour 132 de substance 28 de N.

De même la glycyl-glycyl-glycine à trois molécules d'azote et un seul carboxyle.



au formol 189 de substance donneront 14 de N. de même 189 de substance donneront au Kjeldahl, 42 d'azote.

Toutes choses égales d'ailleurs, si les différents groupes azotés sont toujours les mêmes comme ces derniers, ils doivent, dans cette relation exprimée, fournir des résultats où existent, avec les erreurs de toute opération chimique, un rapport qui varie très peu.

On peut également supposer un peptide nous don-

nant 1 cc. 5 de NaOH N/10 au formol, ce qui représente 0,0210 d'azote et qui au Kjeldahl nous donne 40 cc. NaOH N/10, c'est-à-dire une manifestation 27 fois plus forte en azote. On pourra présumer que cette molécule contient 27 groupes azotés.

Un autre peptide nous donnant 1 cc. 5 de NaOH N/10 en azote initial au formol, et 30 cc. de NaOH N/10 au Kjeldahl, c'est-à-dire sera présumé contenir 20 groupes azotés.

Dans ce 2^e cas, nous avons la même manifestation carboxylique initiale au formol que dans le premier cas, et non la même valeur azotée totale.

Ces hypothèses semblent se réaliser dans le lait où nous avons vu, avec des laits, des indices de formol identiques accuser des valeurs inégales au Kjeldahl.

Ce sont donc des molécules différentes, bien que très voisines, que l'on compare entre elles. Quand un complexe protéique a perdu un peptide, avec ou sans quelques Amino-Acides, on a affaire à une molécule différente.

Si nous nous reportons au tableau d'Alderhalden (1) donnant une moyenne des Amino-Acides trouvés et dosés dans quelques protéines, nous voyons notamment que la Caséine peut se dédoubler en 14 molécules azotées, bien cristallisées, dont le poids moléculaire et la composition centesimale ont été dès longtemps établis; ces 14 groupes azotés se subdivisent eux-mêmes en d'autres molécules d'azote.

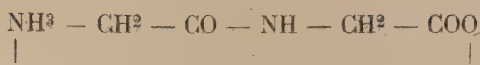
Notamment la Lysine, le Tryptophane et la Cystine contiennent deux groupes azotés, l'Arginine en contient 4 et l'Histidine 3. Nous avons déjà une molécule

(1) Page

de 22 groupes d'azote cachés pour une seule fonction NH_2 ayant prise au bout de la chaîne sur le Formaldéhyde et nous ne comptons pas les peptides et les groupes azotés inconnus laissés dans le résidu sirupeux d'une hydrolyse.

Et en admettant qu'il y ait dans la lactoglobuline et la lactalbumine une série identique ou voisine d'éléments azotés, on peut voir la complexité de l'édifice moléculaire de ces protéines.

La question des matières protéiques étant une des plus complexes de la chimie biologique, on ne peut encore dans l'état actuel de la science que rester dans le domaine purement hypothétique. Les travaux considérables exécutés en ce qui concerne cette question par Fischer et ses élèves, montrent qu'après un labeur énorme de plus de vingt années, on est parvenu à constituer la molécule de peptides à 20 molécules d'azoté. On aurait ainsi atteint, d'après le célèbre chimiste, le milieu moyen des peptones, corps non définis mais qui seraient un mélange de ces peptides. On pourra, grâce à ces peptides rendus actifs par la transformation en acyl dérivés et combinaison avec une base active, s'approcher de plus en plus et rationnellement de la forme complexe des protéines. Et ce seront précisément ces matières protéiques synthétiques qu'on identifiera aux protéines naturelles. Le labeur évidemment, comme le dit l'auteur allemand, sera prodigieux, car il faudra intercaler dans les peptides à forme classique connue ou à enchaînement amidoïde ($\text{CO} - \text{NH}$), des formes enoliques ($\text{C} - \text{OH}$), des formes carbethoxylées ($\text{NH} - \text{COO}$), des formes carbamidées (CONH_2) et des formes à anhydrisation interne



entre une fonction amine et acide.

On ne peut donc, à ce point de vue, fixer une forme de la molécule chimique d'une protéine puisqu'on ne connaît ni le nombre des peptides qui la composent, ni les peptides eux-mêmes qui entrent dans sa molécule.

Mais la formule chimique de ces protéines, au sujet de laquelle les chimistes les plus compétents ne peuvent en l'état actuel de la science donner une forme même approchée, peut théoriquement être assimilée à un peptide plus ou moins complexe.

Si nous supposons que les trois protéines du lait peuvent être représentées par des éléments beaucoup plus simples ou trois peptides nous pouvons émettre les formules suivantes :

- 1° $\text{NH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}^2 - \text{COOH}$.
- 2° $\text{NH}^2 - \text{CH}^2 \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}^2 - \text{CONH} - \text{CH}^2 - \text{COOH}$.
- 3° $\text{NH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO NH} - \text{CH}^2 \text{CO NH} - \text{CH}^2 - \text{CONH} - \text{CH}^2 \text{COOH}$.

Ces trois formules qui représentent la Glycyl-Glycine, la diglycyl-glycine et la triglycyl-glycine sont donc respectivement un dipeptide, un tripeptide et un tétrapeptide, ainsi différenciés en molécules de plus en plus grandes, pour pouvoir établir une ligne de démarcation entre les trois protéines du lait.

Si les trois peptides précités restent les mêmes dans toutes les expériences effectuées, nous aurons la même valeur azotée initiale au formol et la même valeur azotée totale au Kjeldahl. Nous aurons en effet la valeur de trois molécules d'azote au formol ($\text{NH}^2 - \text{NH}^2$

NH²), et la valeur des neuf molécules totales d'azote au Kjeldahl, nous aurons :

$$1^{\circ} \text{ Titration au Formol} = \text{NH}^2 + \text{NH}^2 + \text{NH}^2$$

$$2^{\circ} \text{ Titration au Kjeldahl} = \frac{\text{NH}^2 + \text{NH} + \text{NH}^2 + \text{NH} + \text{NH} + \text{NH}^2 + \text{NH} + \text{NH}}{9}$$

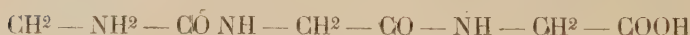
ou le rapport de 3/9.

Les valeurs des deux dosages respectifs donnant aux deux titrations une valeur respective rapprochée de 3/9 nous pourrions dire que les molécules azotées du lait sont toujours les mêmes.

Mais si, dans une 2^e série d'expériences, aux trois peptides ainsi définis nous ajoutons une nouvelle molécule de Glycocolle s'intercalant avec sa liaison amide CO — NH à l'un quelconque des peptides, au premier peptide, à la Glycyl-Glycine, par exemple.

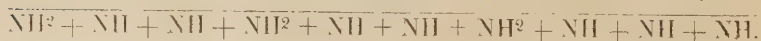


Ce peptide devient :



égal au deuxième peptide qui le suit :

La molécule ne sera agrandie, selon l'expression physique, en azote et bien qu'ayant toujours une manifestation carboxylique initiale elle aura une valeur plus grande au Kjeldahl. Elle sera devenue :



Enfin dans une 3^e série d'expériences, si l'on élimine une molécule du Glycocolle du premier peptide, l'expression : CH² — NH² — CO NH — CH² — COOH, devient : CH² — NH² — COOH,

Le peptide s'est amoindri. La valeur azotée initiale au Formol est toujours la même. Seul le Kjeldahl a diminué.

$$\text{On a : } \frac{\text{NH}^2 + \text{NH}^2 + \text{NH}^2}{\text{NH}^2 + \text{NH}^2 + \text{NH} + \text{NH} + \text{NH}^2 + \text{NH} + \text{NH} + \text{NH}}$$

Ces données hypothétiques semblent se réaliser dans les laits.

Si donc, toutes les fois que nous eussions trouvé, par exemple, 1 cc. 5 en NaOH N/10 à la titration au formol et qu'au Kjeldahl nous trouvions aussi invariablement, ou avec les erreurs d'une opération, un chiffre voisin de 35 cc. de NaOH N/10, c'est-à-dire 4,90 de N par litre, nous pourrions dire que le lait a dans ces deux titrations un rapport qui varie très peu et qui, par conséquent, peut permettre un dosage rapide en $\times$ le résultat de la titration au formol par un coefficient établi.

Mais il résulte des expériences effectuées avec le Formaldéhyde sur le lait :

1° Que ce réactif n'accuse pas sa réaction habituelle sur les Amino-Acides dans le lait;

2° Son action paraît s'effectuer uniquement sur les protéines du lait;

3° Le dosage de ces dernières par le formol est sans doute basé sur un principe juste, mais il n'offre pas dans le lait un degré d'exactitude suffisant, en ce que la relation établie par les auteurs précités peut varier dans certains laits, ce qui tendrait à démontrer que le lait type pour les différents groupements azotés n'existe pas.

4° Notre étude des Amino-Acides du lait a montré

que 0,25 centigrammes en moyenne d'azote sur lesquels n'agit pas le Formaldéhyde doivent être soustraits de l'azote total pour l'établissement du rapport :

Azote révélé par le formol

Azote total

étudié dans le lait par les auteurs cités.

Tableau de l'hydrolyse de quelques protéines (1)

(Pour 10% de substance desséchée)

	Sérum Albumine	Sérum glob.	Caséine	Gélatine	Kératine	Elastine
Glycocolle $\text{CH}_2 - \text{NH}_2 - \text{COOH}$	0	3,52	0	16,50	0,34	25,75
Alanine $\text{CH}_3 - \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH}$	2,68	2,22	0,90	0,80	1,20	6,58
Leucine $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$	20,00	18,70	10,50	2,10	18,30	21,38
Proline $\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} - \text{CH} - \text{COOH} - \text{CH}_2 \end{array}$	1,04	2,76	3,10	5,20	3,60	1,74
Ac. Glutamique $\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \text{CHNH}_2 \text{COOH}$	1,52	2,20	10,70	0,88	3,	0,76
Acide Aspartique $\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH}$	3,12	2,54	1,20	0,56	2,50	
Cystine $\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{S} - \text{CH}_2 \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH} \\ \\ \text{S} \end{array}$	2,30	0,67	0,06			
Sérine $\text{OH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH}$	0,60		0,23		5,70	

(1) ABDERHALDEN, *Zeit phys. chem.*, t. XLIV, p. 23, 1905.

Tableau de l'hydrolyse de quelques protéines (Suite)
(Pour 100 de matière desséchée)

	Sérum Albumine	Sérum glob.	Caséine	Gélatine	Kératine	Elastine
Oxyproline.....			0,25	3,00		
Tyrosine..... $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}^6\text{H}_4 \quad \text{OH} \end{array}$			4,50		0,68	0,34
Histidine..... $\begin{array}{c} \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH} \\ \\ \text{HC} \diagup \text{N} \diagdown \\ \quad \\ \text{HN} \quad \text{CH} \end{array}$			2,59	0,40		
Lysine..... $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \text{ NH}_2 - \text{COOH}$			5,80	2,75		
Arginine..... $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{C} - \text{NH} (\text{CH}_2)_3 \text{CH} - \text{NH}_2 \text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{NH} \end{array}$			4,84	7,62	2,25	0,30
Tryptophane..... $\begin{array}{c} \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{NH}_2 - \text{COOH} \\ \\ \text{C}^6\text{H}_4 \diagup \text{CH} \diagdown \\ \quad \\ \text{NH} \end{array}$	trouvé	trouvé	1,50			

On doit donc demander à la méthode de Sorensen, dans le lait, à l'exclusion de l'azote des Amino-Acides qui n'apparaissent pas à la titration de ce réactif, de dire quel est le % d'azote situé en azote Acido-Aminé

— $\begin{array}{c} | \\ \text{C} \\ | \end{array}$ — NH_2 dans la molécule protéique par rapport à

l'azote total qui comprend, à côté de cette forme aminée, des atomes beaucoup plus nombreux enchaînés dans la liaison amidée qui est celle de la constitution des protéines [— $\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2$]. Cette détermination est intéressante et si elle ne donne pas des poids absolus, elle donne avec précision la marche d'une hy-

drolyse car elle révèle tous les — $\begin{array}{c} | \\ \text{C} \\ | \end{array}$ — NH_2 libérés

chaque fois qu'une molécule d'eau se fixe ($\begin{array}{c} \text{— CO — NH —} \\ | \quad \text{OHH} \quad | \end{array}$
 CH_2) = $\text{COOH} - \text{NH}_2 - \text{CH}_2$

Cette réaction chimique n'est jamais complète. Sorensen (1) a trouvé pour le Glycocolle, l'Alanine, la Leucine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'ornithine, la Sérine, l'Asparagine et pour le NH_4Cl une réaction de 96-99 %

Pour la Lysine, une réaction de 92 %

Pour la Tyrosine, une réaction de 110 %

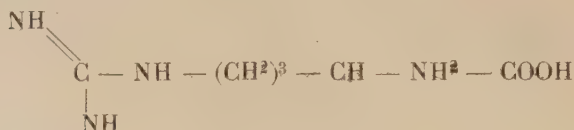
à cause de sa fonction phénolique.

Dans une hydrolyse où on a eu successivement la réaction du Biuret violette, rouge et enfin bleue, lors-

(1) *Biochem. Zeit.*, 7, 45, 1907.

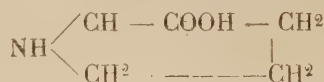
que, les peptides les plus simples et les Amino-Acides ont été mis à nu, on pourra apprécier la fin de l'hydrolyse lorsque la titration au formol n'augmentera plus. Cette titration finale au formol n'exprimera pas l'azote total de la matière protéique.

On peut en effet se rendre compte que des Amino-Acides tels que l'Arginine



joue vis à vis de cette réaction le rôle d'un peptide, car de ces 4 molécules d'azote deux seulement apparaissent au Formaldéhyde.

Quant à la Proline



on n'entrevoit pas pour elle la réussite complète de la titration au formol. Cet Amino-Acide n'a pas dans sa molécule une forme azotée susceptible de contracter une combinaison théorique. Enfin les acides sulfurique, chlorhydrique, détruisent certains groupes azotés dans la molécule protéique, sous forme ammoniacale et sous forme de peptides insolubles à forme sérueuse qui empêcheront d'avoir un rendement théorique.

Le procédé d'Hugounenq et Morel (1) respectant mieux les divers groupes des protéines devrait donner un rendement plus grand à la titration au formol.

Nous pouvons voir d'après le tableau suivant, don-

(1) Page 85.

nant la marche d'une hydrolyse avec la méthode de Sorensen, que le rendement est de 8/15° environ.

Expériences faites avec les acides chlorhydrique et sulfurique pour l'hydrolyse de la caséine.

Hydrolyse de la Caséine par l'acide sulfurique.

20 grammes de caséine sont traités par 20 cc. de $\text{SO}_4 \text{H}_2$ et quantité suffisante d'eau pour 260 cc. Nous avons eu, en des prises successives de 1 cc. de liquide pris par une pipette dans un ballon à deux tubulures adapté au réfrigérant ascendant, au bout d'un quart d'heure, la réaction très franchement rouge des peptones. A la titration au formol, on a :

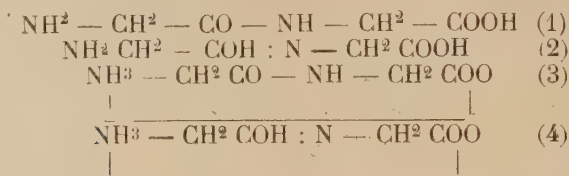
NAOH N/10 en N

1 cc. de cette liqueur donne au bout

1/2 heure	0 cc. 4 = 0,00056
Deux heures après	1 cc. = 0,0014
Deux heures après	1 cc. 3 = 0,0018
Deux heures 1/2 après	1 cc. 6 = 0,00224
Trois heures après (coloration bleue du Biuret)	2 cc. = 0,0028
Quatre heures après	2 cc. 3 = 0,0035
Cinq heures après	3 cc. = 0,0042
Six heures après	3 cc. 3 = 0,00466
Trente-six heures après	6 cc. = 0,0084
Le dosage de N total dans 1 cc. de liqueur a donné.....	9 cc. 3 = 0,01302

Il n'est pas non plus superflu de signaler, à propos de l'imprécision de la réaction du Formaldéhyde sur les Amino-Acides, les protéines et les peptides que

nous venons d'étudier, que Fischer (1); l'un des maîtres incontestés de la chimie de ces substances, a signalé que si la liaison (CO — NH) amidée était admise pour plus de simplicité dans la compréhension des différentes réactions, il y avait encore de nombreux points de litige. On pouvait aussi bien, d'après lui, supposer les formes lactamiques et les sels intra-moléculaires. Ainsi, pour la glycyl-glycine, on pouvait admettre les 4 formules suivantes :

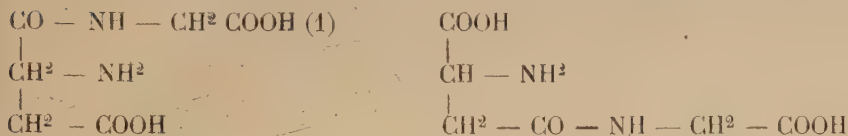


Il avait remarqué que certains polypeptides offrent des états variés. La Leucyldiglycylglycine est soluble dans l'alcool quand il est amorphe; mais si l'on chauffe au bain-marie la solution alcoolique, il se dépose bientôt du tétrapeptide cristallisé peu soluble dans l'alcool.

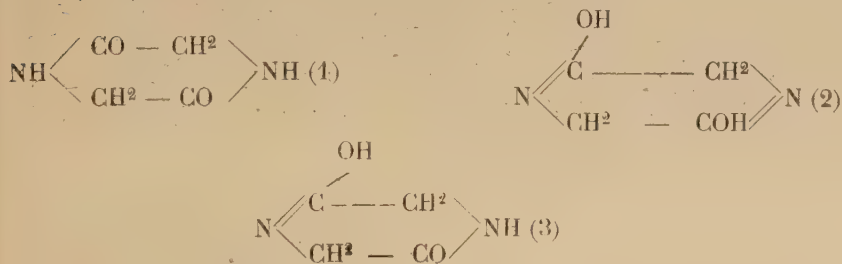
Il signala également les différentes isomeries qui pouvaient exister avec les dérivés carbéthoxylés des polypeptides et sur lesquels il n'y avait encore aucun éclaircissement. Notamment, l'acide glycylglycine carbonique $\text{COOH} - \text{NH} - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}^2 \text{COOH}$ qui est obtenu par saponification du carbéthoxyloate de glycyl-glycine avec un alcali, donne, traité par une solution alcoolique d'Hcl un éther sel, neutre, lequel est isomère avec le premier composé.

(1) *Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft*, XXXVIII, p. 644, 1905.

La structure des polypeptides se compliquait singulièrement quand il s'agissait de fixer la formule des acides Amino-dicarboniques ou des acides diaminés.

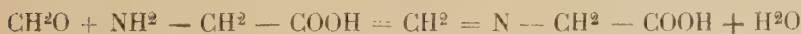


De même, les dicéto-piperazines, qui ont des rapports très intimes avec les dipeptides, peuvent être représentées dans le cas de celle dérivée du Glycocolle par les 3 formules suivantes. En dédoublant l'anhydride d'Alanine par un alcali, Fischer avait remarqué la formation d'un composé alcalin (1).



Ces anneaux piperazinés peuvent exister dans les protéines, selon Fischer, de même que les dérivés carbéthoxylés.

Toutes ces considérations, puisées aux sources les plus autorisées, sont de nature à montrer qu'on est loin, dans le dosage des protéines avec le formol, de l'équation théorique si bien étudiée par Sorensen pour les Amino-Acides



(1) FISCHER. *Ber. d. deutsch chem. Gesellschaft* 1905, pp. 609-2376.

et, par conséquent, dans l'obligation d'en signaler toute l'inexactitude.

Hydrolyse de la Caséine par l'acide chlorhydrique

20 grammes de caséine sont traités par la même quantité en volume d'acide chlorhydrique (60 cc. + Q. S. d'eau pour faire 260 cc.).

Un quart d'heure après survient la réaction rouge du Biuret. A la titration au formol nous avons :

NaOH N/10 en N

1 cc. de cette liqueur donne au bout	
d'une heure	1 cc. = 0,0014
Deux heures après	1 cc. 5 = 0,0021
Deux heures 1/2 après (réaction	
du Biuret bleue)	2 cc. = 0,0028
Trois heures après	2 cc. 2 = 0,00308
Quatre heures après	2 cc. 5 = 0,0035
Cinq heures après	3 cc. = 0,0042
Six heures après	3 cc. = 0,0042
Trente-six heures après.....	6 cc. 2 = 0,00868
Le dosage de N total dans un cc. de	
liqueur a donné	9 cc. 1 = 0,0127

Rôle hydrolysant de l'acide sulfurique sur le lait. —

Nous avons également cherché, pour raisons d'ordre pratique, à obtenir les Amino-Acides du lait sans l'intervention de l'alcool et avec l'emploi de précipitants acides.

Les expériences faites à ce sujet sont intéressantes en ce qu'elles montrent la fragilité de l'édifice chimique des protéines du lait qui peuvent, sous l'influence d'acides forts, se défaire et libérer une quan-

tité plus ou moins grande d'azote que les réactifs ne peuvent plus isoler. En plus elles montreront que les recherches des Amino-Acides doivent exclure le plus possible les réactifs métalliques, car ces derniers, par un phénomène de teinture ou d'adhérence plus ou moins marqué, retiennent les corps fragiles et peu abondants dans les liquides physiologiques. L'emploi du vide et de réactifs précipitants tels que l'alcool acide deviennent évidemment des procédés de choix, et par leur qualité de ne pas altérer le milieu azoté où se trouve les protéines et d'avoir un rendement beaucoup plus grand en azote non protéique.

L'hydrolyse des matières protéiques avait été le point de départ de l'étude de leur constitution. Cette méthode étudiée tout d'abord avec Schutzenberger à l'aide des alcalis (1) fut suivie de celle de Kossel et Kutscher par l'acide sulfurique (2); ensuite vint le procédé d'Habermann (3) par l'acide chlorhydrique.

De nombreux chimistes, tels que Fischer et Abderhalden (4) étudièrent la méthode d'hydrolyse par les acides sulfurique et chlorhydrique et accomplirent de remarquables travaux.

Une quatrième méthode d'analyse des matières protéiques provoqua de remarquables résultats dans l'isolement des dérivés protéiques, c'est celle d'Hugoumenq et Morel (5). Cette méthode paraît aujourd'hui s'imposer, et par l'emploi pratique et peu coûteux qu'elle constitue et par le rendement en Amino-Acides.

(1) *Annales chim. phys.*, 5^e s., XVI, 334.

(2) *Zeit phys. chem.*, XXXI, 165.

(3) HABERMANN, *Zeit phys. chem.*, XXXI, 185.

(4) *Ber* XXXIX, p. 585, et *Zeit phys. chem.*, t. XLIV, p. 23, 1903.

(5) *Bull. Soc. chim.*, 4^e s., 1, p. 153.

La méthode au chlorure d'étain et à l'acide chlorhydrique permirent à Hlasiwetz et Habermann d'obtenir : Pour 100 grammes de caséine desséchée (1) : 9,23 % d'acide aspartique, 29 % d'acide glutamique, 3 à 4 gr. de Tyrosine, 19 à 23 % de Leucine.

Hausmann (7) étudia (Zeit. phys. chem., 1899, t. 27, p. 95) l'action de Hcl bouillant sur la Caséine, il trouva :

13,37 % d'azote amidé,
11,71 % d'azote diaminé,
75,98 % d'azote mono-aminé.

Les chiffres trouvés par Abderhalden pour la Caséine (2) traitée par SO^4H^2 diffèrent des résultats d'Habermann obtenus par Hcl. Notamment l'acide aspartique donna à Abderhalden 1,20 au lieu de 9,23. L'acide glutamique 10,70 au lieu de 29 et 10,50 de Leucine au lieu de 19 à 23 %. L'acide chlorhydrique semblait mieux respecter la molécule protéique dans ses différents constituants.

Quant à l'emploi de l'acide fluorhydrique, il se montrait bien supérieur aux autres. Voici quelques résultats obtenus par Hugounenq et Morel.

Pour un kilog de gélatine :

	Hydrolyse par Hcl	Hydrolyse SO^2H^2	Hydrolyse
Poids totaux des cristaux	215 gr.	260	32
Leucine.....	80	112	15
Tyrosine.....	7	11	1
Alanine.....	88	84	10
Phenyl Alanine.....	40	43	5
Glycocolle.....		18,2	7,

(1) *Annalen der chemie und pharmacie*, t. 169, pp. 50 et 157.

(2) Voir tableau p. 79.

Et le Glycocolle était d'emblée si pur qu'il a donné à l'analyse :

Poids de substance : 0,203.

Volume de N : 33,4.

H = 756 millig. 4, F = 16,3 K = 19.

Azote trouvé : 18,73; Azote calculé : 18,66.

Cette action hydrolysante des acides agissant à chaud sur les matières protéiques peut être obtenu à froid, sur le lait, avec de l'acide sulfurique.

Si nous traitons 10 cc. de lait par 5 cc. de SO_4H_2 , que rapidement on complète le volume à 100 cc, on agite vigoureusement et filtre; on obtient ainsi un liquide d'une clarté parfaite après filtration. Le réactif phosphotungstique élimine du milieu filtré une protéine ne donnant pas la réaction de Milon. On opère après évaporation du liquide un Kjeldahl et on trouve ainsi pour l'azote total une valeur dépassant de 10 centigrammes par litre la valeur azotée totale du filtrat de l'acide acétique : 0,35 centigr. au lieu de 0,25.

Si nous essayons de nous rendre compte s'il faut attribuer la valeur de cet azote à de l'azote non protéique qui n'avait pas pu prendre les réactifs que nous avons étudié, nous voyons parfaitement que l'acide sulfurique a produit une altération de la protéine.

Dans ce but, dédoublons les laits. Si l'azote que nous venons de calculer avec cette augmentation dans la liqueur sulfurique appartient à de l'azote non protéique il doit avoir dans ce lait dilué et toujours traité de la même façon une valeur égale à la moitié du chiffre trouvé, ou une valeur rapprochée.

Or, il n'en est rien, et les chiffres trouvés nous

montrent que nous avons affaire à une hydrolyse des matières protéiques du lait.

Voici les résultats des 4 expériences :

N° des laits.	1	2	3	4
N. soluble.	0,350	0,364	0,356	0,154
Laits dédoublés. . .	0,9	0,28	0,308	0,14

L'expérience du lait n° 4 a été faite par M. le Professeur Favrel, de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Rôle hydrolysant de l'acide sulfurique à froid sur le lait. — Si nous ajoutons à 100 cc. de lait, 100 cc. d'eau + 50 gr. SO^4H^2 + eau pour parfaire un litre, nous avons déjà une hydrolyse moins prononcée et nous trouvons un résultat rapproché de la valeur de N du filtrat de l'acide acétique : $N = 0,299$.

Si nous ajoutons à 100 cc. de lait, 100 cc d'eau + 50 cc. de SO^4H^2 + eau pour un litre, le tout placé dans un mélange réfrigérant, nous trouvons en $N = 0,251$, chiffre très voisin de 0,246 (alcool acétique), ce qui nous fait dire, d'après toutes ces expériences, que l'acide acétique, à 5 contre 10 de lait, même en ajoutant rapidement l'eau pour parfaire un litre, produit un effet hydrolysant rapide et à froid. Cet effet hydrolysant peut être diminué en ajoutant la même proportion d'acide sulfurique à une quantité proportionnelle de lait mais plus grande que 5 cc., et anihilé si on place le tout dans un mélange réfrigérant.

Le procédé à l'acide sulfurique, fait dans de bonnes conditions, peut donc se rapprocher du procédé à l'alcool acétique comme valeur azotée non protéique. Mais on a ici l'inconvénient d'une solution très acide à saturer rapidement avec de la chaux ou de la baryte pour

éviter l'altération des hydrates de carbone. Malgré les précautions les plus grandes, prises pour éviter l'altération de ces principes, nous verrons par les résultats exprimés plus loin que ce procédé donne des résultats bien inférieurs pour l'obtention des Amino-Acides à ceux de la méthode à l'alcool acétique.

Il résultait donc de notre étude des réactifs, et de quelques méthodes, que le meilleur réactif, en vue du procédé à adopter, était l'alcool acide à 65°, car il nous avait déjà permis d'avoir une quantité d'azote total bien supérieure aux autres, et nous avait permis de caractériser des cristaux de Glycocolle, de Tyrosine, de Leucine et d'autres Amino-Acides qui étaient à identifier.

L'azote non protéique dans le lait ne provient pas d'une hydrolyse. — On pourrait prétendre que cet azote non protéique est purement arbitraire et que sa teneur dans un liquide physiologique est fonction du réactif qui a produit sur le milieu protéique une hydrolyse plus ou moins prononcée, de telle sorte que, ainsi que certains auteurs l'ont prétendu, on devait pour doser l'azote non protéique choisir le réactif qui en donne le moins parce que non hydrolysant.

A cette objection nous opposerons les résultats de l'expérimentation :

En ce qui concerne le lait : 1° Le réactif qui donne le plus d'azote non protéique est l'alcool acétique à 1 % dont l'acide organique a une teneur infime 1/1000 par rapport au lait.

2° Les réactifs les plus acides, le phosphotungstique par exemple, donnent une quantité d'azote non pro-

téique infiniment plus faible que l'alcool acétique : 0,14 à 0,17 au lieu de 0,25 à 0,28.

3° L'Amino-Acide le plus important du lait est le Glycocolle qui doit entrer en très faible proportion de 3,50 % dans la molécule de la Lactoglobuline qui elle-même donne une teneur de 2 à 3 grammes par litre de lait.

4° Nos expériences ont établi que les réactifs métalliques n'accusaient pas dans leur filtrat la présence de la Tyrosine. Seul l'alcool acétique la décèle bien. En plus, les Amino-Acides paraissent retenus par un phénomène d'adhérence sur le précipité protéines beurre métal. Enfin les expériences faites avec l'acide sulfurique sur le lait sont de nature également à montrer que l'azote non protéique est un élément fondamental du lait. On ne peut donc supposer qu'un réactif va hydrolyser les protéines du lait et donner un Amino-Acide en quantité notable, inconnu comme constituant de la Caséine et de la Lactalbumine et pouvant être un faible constituant seulement de la Lactoglobuline, dont le poids total ne serait pas deux fois plus élevé que cet Amino-Acide. Cet argument opposé par les résultats du dosage constitue à lui seul, en effet, la preuve que le lait n'est pas un liquide ou les réactifs peuvent produire une hydrolyse et devenir ainsi par la précipitation une portion soluble variant avec le réactif considéré.

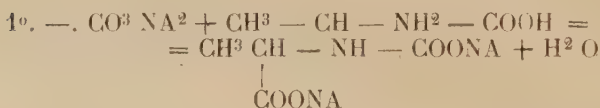
CHAPITRE III

Étude des Amino-Acides du Lait

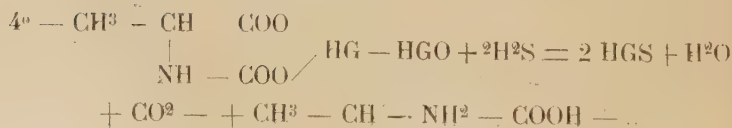
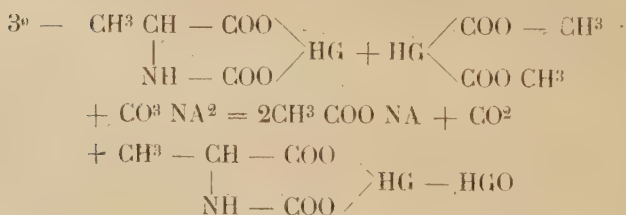
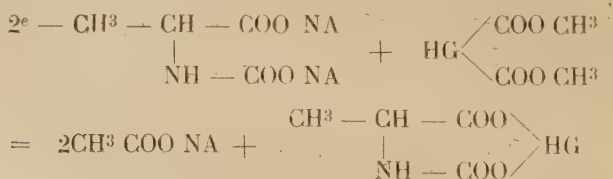
Choix du procédé. — Avec l'alcool acétique à 65° acidifié avec l'acide acétique à 1 o/oo nous avons ainsi en mains un réactif : 1° N'altérant pas les protéines; 2° Fournissant un coagulum facilement et se prêtant facilement à la filtration ou à la centrifugation; 3° Sans métal et dont l'acide organique est facilement volatilisable; 4° Divisant au maximum l'émulsion qu'est le lait, pour en solubiliser le N non protéique; 5° S'évaporant facilement dans le vide avec départ des 3 constituants, alcool, eau, acide acétique; 6° Solubilisant seulement l'azote non protéique et les matières hydrocarbonées. Or, si dans un milieu contenant un Amino-Acide, l'Alanine par exemple, à la dose de 1 gr. + 40 à 45 gr. de lactose représentant à peu près l'un les 2/3 de la valeur de l'azote et l'autre la valeur totale des hydrates de carbone d'un litre de lait, le tout solubilisé dans environ 250 cc. d'eau distillée, que l'on ajoute quelques cc. d'une solution de carbonate de soude à 10 % et, goutte à goutte, une solution d'acétate de mercure préparée à froid, il se forme un précipité blanc-crème dû à une combinaison mercurielle de l'Amino-Acide; l'addition de 5 à 10 cc. d'alcool à 95° favorise la précipitation. On ajoute de temps en temps de la solution alcaline, car il faut opérer toujours en milieu alcalin. On continue à verser goutte à goutte le sel mercuriel jusqu'à excès qui se reconnaît à la formation d'une coloration rougeâtre, due à l'oxyde de mercure formé.

Dans le cas de l'Alanine, on a le processus suivant, d'après la méthode de Karl Neuberg, déjà cité dans la littérature.

1° Le carbonate de soude, en présence de l'Amino-Acide, forme un composé qui contient deux molécules de sodium pour une d'azote; il faut, nécessairement, qu'un hydrogène du groupe NH^2 soit remplacé par $\text{CO}^2 \text{NA}$, c'est un véritable éther carbonique de l'Alanine, dont la fonction acide est également saturée par NA.



2° Le corps ainsi formé, en présence de l'acétate de mercure, forme une combinaison mercurielle insoluble.



On scinde au bain-marie la molécule amino-mercurelle par H^2S .

La solution obtenue en filtrant le précipité sulfhydrique et évaporée dans le vide jusqu'à réduction à peu près au sec, et traitée par l'alcool à 98° fournit une cristallisation de l'Amino-Acide. Cet Amino-Acide desséché et pesé a donné 0,85 centigr. Les filtrats du précipité mercuriel nous ont donné une teneur en azote de 2 centigr. 002; on peut donc voir qu'il y a toujours des pertes soit que le précipité mercuriel ne soit solubilisé, soit que l'acide ne soit pas entré totalement en réaction.

I. -- PROCÉDE DE DOSAGE DES AMINO-ACIDES DU LAIT

Après les données fournies par ces expériences et quelques essais préalables pour le choix d'une méthode à appliquer au lait de vache, on s'est arrêté au procédé suivant :

Pour séparer la caséine et le beurre, on a versé un litre de lait en filet mince dans de l'alcool à 65° renfermant 1/1000 d'acide acétique cristallisable. La quantité d'alcool acétique est dans la proportion de 2,8 pour 1 de lait. Le coagulum a été séparé du liquide limpide par centrifugation et lavé avec de l'alcool à 55° . Les filtrats ont été réduits dans le vide à l'état presque sec, puis traités d'après la méthode à l'acétate de mercure. Le résidu a été repris par 25 à 50 cc. d'eau distillée et additionné de solution de carbonate de sodium à 10 % jusqu'à réaction alcaline au tournesol; puis, à la température ordinaire de 15° , on a versé goutte à goutte de la solution d'acétate de mercure à 25 % préparée à

froid jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité. On ajoute encore 4 cc. d'alcool à 98°, on agite de nouveau. Le précipité crème se sépare facilement du liquide alcalin. On filtre à la trompe à eau et on lave le précipité avec de l'alcool à 80°. Ce précipité, encore humide, est délayé sans retard dans 150 cc. d'eau et décomposé au bain-marie par H^2S . Le sulfure de mercure se dépose, on filtre et le filtrat évaporé dans le vide fournit un résidu grisâtre que l'on reprend par l'eau, filtre de nouveau et évapore encore une fois dans le vide. Il en résulte un magma blanc en petits cristaux qu'on fait cristalliser dans de l'alcool à 98° en flacon bouché, ou mieux qu'on laisse sous la cloche à vide.

1° Teneur en azote de ce produit calculé par
litre de lait 0,205

Teneur en azote des eaux-mères (filtrat du
précipité mercuriel) 0,041

Azote total non protéique, par litre..... 0,246

Poids de ce produit azoté, cristallisé pour
1 litre de lait 1,010

L'expérience a été renouvelée plusieurs fois, nous donnerons tout à l'heure un tableau de la moyenne pondérale de ce produit.

2° Poids du produit azoté non protéique..... 1,081

Azote précipité comme Amino-Acide..... 0,200

Azote dans les filtrats de ce précipité..... 0,081

Azote total non protéique..... 0,281

Il fallait démontrer que cet azote non protéique est un Amino-Acide, et dire lequel parmi les nombreux éléments de cette classe. On a donc cherché à identifier ce produit.

Le produit cristallisé, ainsi obtenu, est sans odeur, son goût est sucré, son point de fusion est compris entre 229 et 230°. Les cristaux sont solubles dans 4 fois leur poids d'eau, insolubles dans l'alcool et dans l'éther. Le poids moléculaire a été déterminé d'après la méthode cryoscopique (loi de Blagden et Raoult) dans un appareil de Beckmann; l'expérience répétée a donné :

$$76,2 \qquad 76,8 = \text{Moyenne } 76,5.$$

0,10 de cette substance nous ont donné par la méthode de Kjeldahl, 0,0184 de N — calculé 18,66.

Le produit est facilement soluble dans l'eau froide, insoluble dans l'alcool absolu et dans l'éther. La réaction du Biuret donne une coloration bleue-foncé, l'addition d'acide azoteux dans la dissolution de ce produit donne un liquide qui se colore en jaune serin par le réactif (d'Ueffelmann). Le poids moléculaire serait donc celui du Glycocolle, le point de fusion correspondrait également, de même la teneur en azote. On a voulu préciser et on a continué les expériences suivantes :

On a mis en suspension 0,50 centigr. de ce produit, en chauffant légèrement dans 15 gr. d'alcool à 98° et saturé cette solution avec du gaz HCL. (On place dans un petit cristalliseur le récipient contenant la solution alcoolique du glycocolle, ce cristalliseur contient de la glace et du sel marin). Le passage de HCL gazeux est pratiqué lorsque le produit se trouve dans le mélange réfrigérant. Cet HCL est fabriqué en versant 40 gr. de SO^4H^2 ordinaire sur 30 gr. de NaCl et 10 gr. d'eau, puis on sèche le gaz produit dans des barboteurs contenant de l'acide sulfurique.

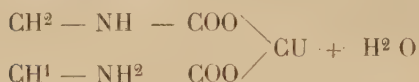
Les cristaux qui se produisirent furent recueillis et

lavés à l'alcool ayant une température de 0°, puis séchés dans le vide. Ces cristaux donnèrent :

	Trouvé
Point de fusion	144°
Teneur en azote	10,01 %
Teneur en chlore	25,44 %
	Calculé
Point de fusion	145°
Teneur en azote	9,4 %
Teneur en chlore	24,06 %

Pour la formule $\text{CH}^2 - \text{NH}^2 - \text{COOH} - \text{C}^2\text{H}^5 \text{HCL}$.

Préparation du sel cuivrique.



Un cristal de sulfate de cuivre a été solubilisé dans de l'eau distillée, on ajoute goutte à goutte NAOH jusqu'à précipitation complète de l'oxyde de cuivre hydraté, on a recueilli ce dernier sur un filtre et lavé à eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage n'ont plus coloré la phtaléine. Le produit précédemment obtenu a été ajouté par petites quantités à une solution aqueuse de l'Amino-Acide et cela jusqu'à refus. Le léger excès ajouté laisse un précipité d'oxyde cuivrique non combiné, la solution filtrée a été évaporée dans le vide, au bain-marie, et lorsqu'il n'est plus resté que 5 ou 6 cc. de liquide, on a précipité le produit par alcool à 95°; on a capté le produit ainsi obtenu sous forme de belles aiguilles bleues, on les a essorées à la trompe et desséchées dans le vide jusqu'à poids constant.

Le cuivre a été dosé sur 0,10 centigr. de produit.

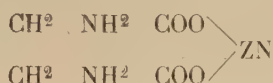
Trouvé : 0,0264 de cuivre

Calculé : 0,0277.

Préparation du dérivé picrique.

Une solution alcoolique d'acide picrique a été versée dans quelques cc. d'une solution aqueuse de notre produit, le tout a été mis à la glacière et, quelques heures après, nous avons recueilli de belles lamelles rhombodriques et hexagonales de picrate de glycolle.

Préparation du dérivé zincique.



On a suivi la même méthode que pour le sel cuivrique; on a ajouté, par petites quantités, de l'oxyde de zinc dans une solution aqueuse du produit jusqu'à refus; on a filtré, évaporé le liquide à quelques cc. et on a laissé cristalliser en ajoutant de l'alcool à 98°, on a maintenu en flacon bouché quelques heures, on a recueilli le produit sur un filtre, essoré à la trompe et desséché dans le vide.

0,15 centigr. de produit ont donné : 0,041 de zinc.

Calculé : 0,04221.

Préparation de l'acide hippurique.

Ce produit est l'amide benzoïque du Glycolle; il a pour formule $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{COC}^6\text{H}^5$, c'est un hydrogène du groupe aminé remplacé par le radical benzoyl. On a solubilisé une petite quantité du produit obtenu par la méthode à l'acétate de mercure dans de

l'eau alcalinisée avec NaOH ; on a ajouté un excès de chlorure de benzoyl, on a alcalinisé de nouveau et on a laissé 24 heures, on a ensuite neutralisé la solution et acidulé avec HCL . Il s'est formé un précipité qu'on a traité par éther; il est resté comme résidu un corps se présentant sous la forme de prismes rhomboïdaux, solubles dans 600 gr. d'eau froide et dans la moitié du même volume d'eau chaude. Insoluble dans l'éther et la ligroïne; si on chauffe ce corps dans un tube à essais en verre fort à plus de 200° on peut avoir la réaction de l'acide cyanhydrique, sa dissolution rougit le papier tournesol, l'ébullition avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique reproduit le glycocolle et l'acide benzoïque. La Soude produit le même effet.

Préparation du produit purifié par la méthode de Fischer.

Nous avons soumis à l'action de l'alcool absolu 1 gr. 045 du produit obtenu précédemment (action simultanée de l'alcool à 98° et de l'acide chlorhydrique à la glacière.)

Nous avons saturé le produit éthéré par BAO ; plusieurs méthodes étaient indiquées, Emile Fischer (Ber XXXIX, page 585) dissout la masse des chlorhydrates dans alcool absolu glacé, et élimine HCL en alcalinisant avec solution de sodium dans alcool, et fait passer ainsi l'éther en l'alcool.

Levene et Alberg (Journ. of biolog. chemistry, t. II, p. 127) remplacent la soude et le carbonate de potasse par BAO en poudre. Le défaut de la première tech-

nique, comme le prétend Albert Morel (précis de technique chimique, page 542) est de perdre une bonne partie des éthers dans la pâte ainsi formée au sein du liquide. L'emploi de la baryte supprime cet inconvénient. On a donc versé une petite quantité d'oxyde de baryum dans la solution du chlorhydrate d'éther du Glycocolle; le magma ainsi formé a été agité avec de l'alcool absolu; cet alcool a été évaporé dans le vide, on a repris le résidu par eau distillée et fait bouillir deux heures au réfrigérant ascendant. L'eau a été chassée par le vide, on a eu ainsi..... 0,987

Nous avons par conséquent trouvé 94,64 %
du produit primitif;

Les pertes, par cette méthode, sont donc de. 5,36 %

Nous avons fait de nouveau la vérification du poids moléculaire de l'Amino-Acide, nous avons eu, dans un premier essai :

$$\text{Formule} = M = K \frac{P}{A}$$

1^{er} essai : pour 100 gr. de H²O

$$A = 0^{\circ} 25$$

Poids dissous 1 gr. 0, 09

		trouvé	calculé
pour H ² O	{ 19	76,8	75
	{ 18,5	74,66	

2^e essai :

$$A = 0^{\circ} 25$$

Poids dissous 1 gr. 0013

		trouvé	calculé
pour H ² O	{ 19	76,09	75
	{ 18,5	74,09	

Composition centésimale.

		trouvé	calculé
1 ^{er} essai :	Prise d'essai 0.19		
C O ² = 0.2250	C %	32.29	32
H ² O = 0.1146	H %	6.70	6.66
N H ³ = 0.0427	N %	18.50	18.68
O par différence	O %	42.51	42.68

		trouvé	calculé
2 ^e essai :	Prise d'essai 0.210		
C O ² = 0.2474	C %	32.12	32
H ² O = 0.1266	H %	6.69	6.66
N H ₃ = 0.0472	N %	18.50	18.68
O par différence	O %	42.69	42.68

Procédé par l'acide sulfurique.

Le procédé par l'acide sulfurique à 5 % nous a donné 0 gr. 60 d'Amino-Acide, sans passer par la méthode au chlorhydrate d'éther de Fischer. On peut voir, par ce résultat, qu'il y a une grande perte de l'Amino-Acide. Ce procédé demande, en plus, de très nombreux lavages, une saturation très grande de l'acide sulfurique par BAO, et l'Amino-Acide se perd par adhérence aux énormes masses de précipité. Lorsque le liquide a été neutralisé, on verse, lorsqu'il n'y a plus que quelques cc. de liquide, de l'acétate de mercure en milieu alcalin et on continue comme pour le procédé déjà décrit.

Nous avons obtenu 0,63, 0,657 et 0,71 d'Amino-Acide.

Procédé par le réactif phosphotungstique.

Un litre de lait est traité par, environ, un litre de réactif phosphotungstique déjà décrit. Le liquide est traité par la baryte en excès pour éliminer le réactif. La baryte en excès est traitée par un fort courant de

CO² au bain-marie, et lorsque le liquide évaporé est réduit à 50 cc., on continue par le procédé Neuberg. Tous ces procédés ont l'inconvénient d'altérer non seulement les protéines, mais également de donner un liquide jaunâtre provenant de l'altération des hydrates de carbone.

Cette méthode, au réactif phosphotungstique, nous a donné 0,405, 0,552 et 0,508.

TABLEAU COMPARATIF
pour la valeur du dosage de l'Amino-Acide.

1° Méthode par l'alcool acétique.

1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai	4 ^e essai	5 ^e essai
1,010	1,008	1,009	1,0013	1,045
	6 ^e essai	7 ^e essai		
	1,09	1,10		

2° Méthode au chlorhydrate d'éther de Fischer, à la suite de notre procédé.

1 ^{er} essai	2 ^e essai
0,98	0,85

3° Méthode au phosphotungstique, non suivie de la purification de Fischer.

1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai
0,405	0,552	0,508

4° Méthode avec SO⁴H² non suivie de la purification de Fischer.

1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai
0,63	0,657	0,71

II. PROCÉDE DE DOSAGE DES AMINO-ACIDES DU LAIT DE VACHE

2^e série d'expériences.

Mais si le Glycocolle semble être l'Amino-Acide libre fondamental du lait, ou son groupe azoté non protéique le plus important, on ne peut pas conclure que c'est le seul Amino-Acide contenu dans le lait de vache; d'autres Amino-Acides s'y trouvent, mais leur quantité très minime pour un seul litre de lait est telle qu'on ne peut les reconnaître que qualitativement. Nos expériences sur les réactifs nous avaient montré la Leucine, la Tyrosine et d'autres Amino-Acides.

Au dosage de l'azote, des traces de Tyrosine et de Leucine ajoutées à un gramme de Glycocolle, ne produisent pas un résultat notablement différent, car l'azote dans la Tyrosine et la Leucine représente un chiffre plus faible pour la totalité de la molécule. L'examen microscopique peut, par contre, montrer à côté de la cristallisation typique du Glycocolle des cristaux en houppes et fines aiguilles de Tyrosine ou des lamelles brillantes avec des sphérules de Leucine. En même temps, l'ensemble de la cristallisation peut donner les réactions typiques de coloration de la Tyrosine et ce complexe Amino-Acide nous montre certaines particularités, notamment une solubilité non complète dans l'eau, si au Glycocolle se mêlent de la Tyrosine et les acides aspartique et glutamique.

Or, nous avons déjà caractérisé au microscope de la Tyrosine, de la Leucine, et des octaèdres, et des tablettes quadrangulaires très brillantes qui ne sont pas

la cristallisation du Glycocolle. Le résidu, insoluble dans l'eau, a une saveur manifestement acide au goût.

En plus le poids moléculaire donne :

Une première fois.....	140,8	} Moyenne 141,8
Une deuxième fois.....	144,2	
Une troisième fois.....	140,4	

En même temps se fait une remarque importante. A mesure que se produit l'évaporation dans le vide, il se forme un dépôt plus ou moins grand, et qui augmente à mesure que diminue le liquide d'évaporation. La solubilité du Glycocolle seul eut été complète jusqu'à la fin, ainsi que cela s'était produit dans un certain nombre de nos expériences précédentes mais s'il y avait dans le résidu cristallisé des traces de Leucine, cette solubilité diminuait légèrement et devenait très minime si se trouvait au sein du liquide des Amino-Acides, tels que la Tyrosine et les acides aspartique et glutamique.

Nous avons donc cherché, en présence de ces données, à exécuter un certain nombre d'expériences qui nous permettent d'apporter des conclusions plus précises pour la question des acides aminés du lait de vache. Le résultat de ces expériences nous permettrait ainsi, en opérant sur une vingtaine d'échantillons provenant d'individus différents, d'établir une meilleure moyenne des Amino-Acides du lait de vache.

Après avoir déjà établi que l'on peut trouver un gramme environ de Glycocolle par litre dans le lait de vache et avoir ainsi montré que ce Glycocolle peut être accompagné d'éléments azotés à identifier, formant dans l'ensemble des expériences une moyenne

de plus de un gramme de produit cristallisé on a donc chercher à isoler ces Amino-Acides.

A cet effet on a traité 20 litres de lait par dix opérations successives, c'est-à-dire, on a opéré sur deux litres chaque fois, et on a réuni le produit des dix opérations pour la séparation des différents éléments.

Le vingt litres de lait ont été prélevés à des intervalles assez longs sur des vaches différentes, très saines, nourries dans les meilleures conditions. Ces traites furent faites avec le plus grand soin et après avoir nettoyé avec de l'eau distillée bouillie et tiède le pis de la vache. A chaque traite de un litre, on a filtré le liquide à travers de minces couches de coton hydrophile posées entre deux plaques tamis. Tous ces laits, successivement, ont été traités immédiatement par la méthode que nous avons préconisée pour l'obtention des acides aminés du lait, c'est-à-dire coagulation à l'alcool acétique à 65° à 1/1000 (2,8 d'alcool pour 1 litre de lait), centrifugation et évaporation au vide et traitement par acétate de mercure au milieu alcalin. Toutes ces précautions ont été prises en prévision de fermentation ou de dédoublement protéique.

Au terme des différentes opérations, nous avons obtenu un produit presque blanc, anhydre présentant dans sa masse les cristallisations différentes déjà mentionnées et où, à côté de l'hexagone oblique et du rhomboèdre, on trouve des houppes et pinceaux, des sphérules et des lamelles quadratiques, cristaux appartenant chacun respectivement à un élément azoté différent.

Le poids de ce complexe acido-aminé retiré de 20

litres de lait est de 20.020 gr. = 1.001 par litre
 La teneur en N pour 20 litres = 4.004 = 0.2002 par litre
 La teneur des eaux-mères... = 1.004 = 0.0502 par litre

5.008 = 0.2504 par litre

on peut remarquer combien ces moyennes sont proches de celles obtenues dans la 1^{re} série d'expériences (1,047 de moyenne sur 7 expériences 1^{re} série).

Le poids total de 20.020 grammes de produit cristallisé obtenu de ces 20 litres de lait se répartit ainsi sur les 10 opérations successives :

1 ^{re}	1.999 grammes
2 ^e	1.090 grammes
3 ^e	2.006 grammes
4 ^e	2.000 grammes
5 ^e	1.983 grammes
6 ^e	2.061 grammes
7 ^e	1.987 grammes
8 ^e	1.997 grammes
9 ^e	1.990 grammes
10 ^e	2.007 grammes

Séparation des Amino-Acides. — Le complexe acido-aminé a été traité pendant trois heures au réfrigérant ascendant par l'alcool à 95° bouillant. La plus grande partie du produit est restée non soluble dans cet alcool. Cette portion insoluble a été reprise par l'eau distillée à 25° et cette dissolution aqueuse a été filtrée et évaporée dans le vide. Il en est résulté un résidu A.

La portion insoluble dans l'eau distillée, plutôt minime, a été reprise par de l'eau ammoniacale qui a complètement solubilisé le produit. Cette solution fil-

trée, puis évaporée d'abord au bain-marie, ensuite dans le vide, a été ensuite exposée à l'air dans un exsiccateur. Il en est résulté un résidu B.

La solution alcoolique extraite du complexe acido-aminé a été évaporée à sec; le résidu repris par une solution d'acide acétique faible (0,5 pour mille), cette solution acétique a été épuisée par agitation avec de l'éther contenant 10 % d'alcool absolu. Cet éther alcoolique a laissé après évaporation un résidu qui a été épuisé à chaud dans un ballon à réfrigérant ascendant par l'alcool dilué ammoniacal (70 alcool plus 30 eau distillée plus 1 de NH_3 en solution) et cette solution filtrée et évaporée a laissé un résidu C.

La portion insoluble dans l'éther alcoolisé a été évaporée et reprise par l'alcool à 50° bouillant. La partie insoluble dans cet alcool a fourni après dessiccation un résidu D. Enfin, la partie soluble dans l'alcool à 50° a été concentrée et reprise par eau distillée additionnée d'hydroxyde de plomb, fraîchement précipité par l'ammoniaque. On a filtré, décomposé le filtrat par H_2S , séparé le PbS et après évaporation on a desséché; il en est résulté un résidu E.

Les produits ainsi obtenus ont été ensuite identifiés. Le microscope avait été déjà un bon guide pour nous et nous avait permis de présumer que le nombre des Amino-Acides du lait était relativement limité, en rapport avec la multiplicité de ceux obtenus par l'hydrolyse des matières protéiques. Nous avons ainsi pu obtenir, sans passer par la longue et difficile méthode d'Éthérification de Fischer (utile surtout dans une hydrolyse) par simple sélection de solubilité des produits dont la combustion et le poids moléculaire se

sont rapprochés des chiffres théoriques. Le résidu A, insoluble dans l'alcool, très soluble dans l'eau, nous a donné les mêmes réactions que celles citées dans la première série d'expériences. Les dérivés cuivrique, zincique et l'amide benzoïque de cet élément azoté nous ont fait reconnaître le Glycocolle.

Deux combustions ont été effectuées avec :

	1° 0,207 gr.	2° 0,198 gr. de produit
CO ²	0,2444	0,2336
H ² O	0,1246	0,1194
NH ³	0,0468	0,0448

Ces chiffres correspondent à %

		moyenne théoriquement		
C	32.20 %	32 - 18	32 - 19	32
H	6.69	6 - 70	6 - 695	6.67 pour C ² H ⁵ NO ²
N	18.62	18 - 63	18 - 625	18.66
O	42.49	42 - 49	42 - 49	42.67

détermination du poids moléculaire.

(pour 100 gr. d'eau) abaissement du point de cong. Δ

$$\text{Formule : } M = K \times \frac{P}{\Delta}$$

1°
2°

Δ	=	0.256	0.249	degrés
grammes				
de substance P =	1.014	0.981	grammes	
K =	19.	19.		
Poids moléculaire	75.26	75.16		
moyenne	75.21			

Le point de fusion a donné 235°8 C.

Le produit A est par conséquent du Glycocolle.

Le résidu B se présente sous forme de houpes soyeuses et de fines aiguilles presque insolubles dans

l'eau, l'alcool et l'éther. Très soluble dans l'eau ammoniacale; les réactions de Piria, de Milon, de Denigès, de Moerner se produisent avec netteté. La réaction de Scherer fournit sur la lame de platine une belle tache de nitrate de nitro-tyrosine que l'hydroxyde de sodium colore en jaune rouge très vif.

La combustion a donné les résultats suivants :

pour 0,1787 de substance		pour 0,1824 de substance	
CO ² 0,3911	—	— 0,3991	—
H ² O 0,0978	—	— 0,0999	—
NH ³ 0,0168	—	— 0,0171	—

ces chiffres correspondent à			moyenne	théoriquement	
C.	59.63	59.67	59.65	59.165	pour
H.	6.09	6.09	6.09	6.08	(C ⁹ H ¹¹ NO ³)
N.	7.74	7.72	7.73	7.73	
O.	26.54	26.52	26.53	26.52	

La détermination du P. M. par cryoscopie n'a pas été effectuée en raison de la mauvaise solubilité du produit. Le point de fusion a donné à 2 reprises : = 235° C. Le produit est donc de la Tyrosine.

Le résidu C, après redissolution et purification, a l'aspect de lamelles très réfringentes et de sphérules de différentes grosseurs. Le point de fusion est 170°2 C. Le produit chauffé se volatilise et se condense en prenant l'aspect de flocons laineux comme l'Alanine en dégageant une odeur d'amyl amine si on chauffe avec de la baryte en poudre. La réaction de Scherer avec la lame de platine donne un résidu incolore que l'hydroxyde de sodium colore en brun.

La combustion a donné les résultats suivants :

pour 0 178 de prod. CO ²	0.3589	2 ^e pour 0.181 de prod.	0.3661
H ² O	0.1591		0.1620
NH ³	0.0230		0.0234

Ces chiffres correspondent à :

moyenne théoriquement				pour	
54.99	55.16	55.075	54.96		
9.93	9.94	9.935	9.92		C ⁶ H ¹³ N ⁰²
10.64	10.65	10.645	10.69	CH ³	$\left. \begin{array}{l} \text{CH}^3 \\ \text{CH}^3 \end{array} \right\} \text{CH} - \text{H}^2 - \text{CH} - \text{COOH}$ NH^2
24.44	24.25	24.345	24.43	CH ³	

Détermination du poids moléculaire :

Abaissement du point de congélation (16.5) de l'acide

Acétique glacial Δ 0.263

Grammes de substance P 0.8884

K pour acide acétique K 39

$$M = K \times \frac{P}{\Delta} \quad M = 131,8$$

Le produit C est donc de la Leucine.

Le résidu D, dont la quantité est très minime, forme des prismes incolores (voir plus loin les dosages quantitatifs), insolubles dans l'alcool et très peu solubles dans l'eau froide, solubles dans vingt parties d'eau distillée bouillante. Sa solution neutre dévie à gauche le plan de polarisation tandis qu'une solution acidulée de cet Amino-Acide dévie à droite. La combustion de 0,1751 de substance a donné

théoriquement			
....	0,2318	} correspondant à	C = 36,10 36,09 pour
....	0,0829		H = 5,26 5,26 C ⁴ H ⁷ NO ⁴
....	0,0224		N = 10,54 10,53
			O = 48,10 48,12 COOH — CH ² CH — COOH
			NH ²

Le résidu D est donc de l'acide aspartique.

Le produit E, après redissolution dans alcool à 50° et purification, est une masse formée de cristaux et de tablettes tétraédriques dont le point de fusion est de 197°5 C. Insoluble dans l'alcool dilué, soluble à 1/100 dans eau à 15°; l'eau bouillante le solubilise davantage. La réaction de ce produit est nettement acide, sa solution décompose les carbonates.

La combustion a donné :

1° Pour 0,192 de substance 2° Pour 0,180 de substance

CO ²	0,2286	0,2706
H ² O	0,1059	0,0998
NH ³	0,0222	0,0210

équivalent à :

1°	2°	moyenne	théoriquement	
C. = 40,99	41	40,995	40,816	pour
H. = 6,13	6,16	6,145	6,122	C ⁵ H ⁹ NO ⁴
N. = 9,52	9,61	9,565	9,524	
O. = 43,36	43,23	43,295	43,538	COOH — CH ² — CH ² — CH — CO NH ²

Le sel de calcium formé lorsqu'on traite la solution par carbonate de chaux se précipite lorsque la solution est évaporée et traitée par alcool. Ce sel de calcium a laissé à la combustion des cendres dont la teneur en CA est de 21,55 % de CA correspondant à C⁵ H⁷ NO⁴ CA ou glutamate de calcium.

Le résidu E est de l'acide glutamique.

Les dosages quantitatifs effectués sur les produits ainsi obtenus ont donné les chiffres suivants :

Dans le complexe		
	Acido-aminé	Dans le lait
Glycocolle	65,25 %	0,0652 %
Tyrosine	9,00 %	0,0090 %
Leucine	9,18 %	0,0092 %
Acide aspartique	1,98 %	0,0020 %
Acide glutamique	5,37 %	0,0054 %
	90,76 %	0,0908 %

On a donc identifié 90,76. % de l'ensemble du complexe acido aminé du lait de vache.

Les 9,24 % qui restent sont dus aux pertes et vraisemblablement a des peptides de forme simple échappant à l'action des réactifs solubilisants et se trouvant à l'état de liberté avec ces différents Amino-Acides. Nous devons ajouter, en effet, que parmi les résidus extrêmes laissés dans les différents réactifs, nous avons découvert des produits de coloration grisâtre et n'ayant pas de cristallisations propres. Ces corps, qu'il serait difficile d'identifier, donnaient la réaction bleue du Biuret et avaient la forme de grains de sable ou de poussière au microscope. Pour ceux dont l'habileté chimique est assez grande pour les isoler il serait intéressant de connaître si on a affaire à un di, tri ou polypeptide composé des Amino-Acides déjà trouvés ou, au contraire, de nouvelles molécules chimiques. Mais cet isolement paraît énorme en difficultés, car ces corps sont à l'état de traces dans certains laits seulement.

Par une étude faite sur quelques laits seulement, en isolant selon la méthode indiquée l'Amino-Acide ou le

complexe acido-aminé on pourrait avoir des conclusions assez imprécises. Notamment, nous avons pu voir dans la première série d'expériences qu'on pouvait avoir des laits où on ne trouve que du Glycocolle sans Tyrosine ni Leucine. Le poids moléculaire de l'Amino-Acide fondamental du lait, ainsi que sa composition centésimale, se rapproche du chiffre théorique.

Dans d'autres laits, au contraire, la vérification de ces constantes physiques est toute autre, les réactions de coloration également et le microscope décèle des cristallisations où abonde une forme de cristal qui n'avait pas paru dans l'examen précédent. Le poids du complexe Amino-Acide paraît avoir une constance remarquable; sa valeur totale azotée également varie peu; seule existe une différence dans les éléments azotés.

III^e expérimentation. — La méthode que nous venons d'employer a sans doute le grand avantage de n'avoir comme réactif précipitant les matières protéiques du lait qu'un mélange d'alcool et d'acide qui, dilué dans la masse du lait, n'aura qu'une teneur infime en acide. Cette méthode à l'acide acétique a été du reste préconisée par Abderhalden (1) pour la précipitation des protéines du sang.

Mais on peut lui objecter toutefois que la quantité d'acide, quoique infime, est suffisante pour mettre en liberté des Amino-Acides d'un peptide composé de Glycocolle, de Leucine, de Tyrosine et des acides aspartique et glutamique. Car si l'acide acétique dispa-

(1) *Zeit für phys. chem.*, 88, 478.

rait, pour une grande partie, dans le vide, il en reste toujours dans le résidu d'évaporation.

Or, ce résidu d'évaporation est resté en contact pendant au moins vingt-quatre heures avec l'acide acétique et en admettant que l'hydrolyse ne soit pas totale on ne peut ainsi affirmer que les Amino-Acides puissent exister à l'état libre dans le lait.

En ce qui concerne l'hydrolyse, d'après Fischer (1), les polypeptides artificiels se comportent d'une façon analogue aux peptones et aux protéines. Il suffit de faire bouillir pendant cinq heures avec Hcl concentré pour amener la scission intégrale en Amino-Acides. Ce même acide chlorhydrique à 10 % les attaque d'une façon assez paresseuse, selon l'expression de l'auteur. Mais les polypeptides naturels sont facilement dédoublés par les ferments digestifs, alors que les peptides artificiels ne le sont pas. Cette attaque dépend de la nature des groupements, de la longueur de la chaîne et en particulier de la configuration de la molécule, les polypeptides artificiels étant racémiques, c'est-à-dire inactifs sur la lumière polarisée, tandis que les polypeptides naturels sont tous à l'état de droit ou de gauche.

On a donc de nouveau laisser tomber un litre de lait goutte à goutte dans 2,800 d'alcool acidifié avec l'acide acétique cristallisable (alcool à 65° contenant 1 pour 1000 d'acide acétique). On a séparé le coagulum par centrifugation, on a filtré. Le filtrat a été évaporé dans le vide après avoir été neutralisé très exactement avec

(1) Recherches sur les Acides Aminés, les protéines et les polypeptides. *Moniteur scientifique*, t. XX, II partie, p. 499.

une solution de carbonate de sodium et réduit en un extrait presque sec.

Cet extrait a été repris par de l'eau distillée et traité selon la méthode de Carl Neuberg (1) par l'acétate de mercure en milieu toujours alcalin. Le précipité blanc-crème tout d'abord s'est transformé par un excès de sel de mercure en une couleur rouge orangé. Isolé sur un filtre et essoré à la trompe il a été mis en suspension dans de l'eau distillée et traité par H^2S . Le sulfure de mercure a été séparé et la solution claire a été évaporée dans le vide.

Il en est résulté un produit grisâtre qui a été traité par l'eau distillée. La solution a été filtrée et évaporée de nouveau dans le vide. On a eu, en fin d'opération, un produit presque blanc, bien cristallisé, pesant 0,9141 grammes pour un litre de lait.

Ce mélange a été épuisé 3 heures au réfrigérant ascendant avec l'alcool à 95° bouillant. Une certaine partie du produit s'est solubilisée. La partie insoluble dans l'alcool a été traitée par l'eau distillée. La solution aqueuse a été évaporée dans le vide et a laissé comme résidu des cristaux du poids de 0,551 grammes.

Le poids moléculaire a été déterminé par cryoscopie, Dans 100 grammes d'eau :

$$\begin{aligned} \Delta \text{ abaissement du point de congélation} &= 0,43 \\ G \text{ grammes de produit} &= 0,509 \\ K \text{ pour eau} &= 19 \\ \Delta &= \frac{G}{M} K = M (\text{poids moléculaire}) \dots = 74,4 \end{aligned}$$

Nous pouvions donc dire, après ces résultats, que les

(1) Loc. cit.

Amino-Acides trouvés dans l'azote non protéiqué du lait ne provenaient pas de l'hydrolyse d'un polypeptide.

CONSIDERATIONS BIOLOGIQUES

Le lait étant un aliment essentiel on peut se demander ce que signifie la présence d'Amino-Acides dans ce milieu à la dose de 1 gramme environ, formant un minimum de 0,20 centigrammes d'azote.

De nombreux auteurs ont déjà démontré le rôle physiologique de ces acides aminés et la transformation de ces corps au sein de l'organisme.

Les expériences faites par tous ces auteurs avaient des buts différents. Les uns ont voulu contribuer à une étude de la valeur nutritive des Amino-Acides. Hansen, Henriques (1), Abderhalden et Rona (2), Cohnheim et Lülhje (3) ont essayé de maintenir l'équilibre azoté chez des chiens avec différents Amino-Acides. Ces auteurs n'ont expérimenté que des cristalloïdes à l'exclusion des polypeptides. Ils ont démontré qu'il y avait des différences d'alimentation selon que ces Amino-Acides provenaient de l'hydrolyse par les ferments et par les Acides. La Trypsine fournit des Amino-Acides ayant une valeur nutritive comme la protéine qui les fournit. L'hydrolyse acide fournit au contraire des Amino-Acides qui passent intégralement dans l'urine, de telle sorte que les animaux auxquels on fait ingérer ces Amino-Acides vivent aux dépens de leurs propres albumines. Abderhalden et Frank (4) ont démontré

(1) *Zeit phys. chem.*, 43, 417, 1905; 54, 406.

(2) *Zeit phys. chem.*, 42, 528.

(3) *Archiv. Pflüger*, 63, p. 547, 1906.

(4) *Zeit phys. chem.*, 64, 158.

que l'action des acides sur les protéines avait trop de violence, au point que certains Amino-Acides comme le Tryptophane avait sa molécule détruite. Si l'on donne à des chiens des Amino-Acides provenant d'une hydrolyse avec SO_4H_2 , auxquels on a ajouté 0,5 % de Tryptophane, on peut maintenir leur équilibre azoté durant quatre semaines.

D'autres auteurs, Galimard, Lacomme et Morel (1), Ehrlich (2), Czapek (3), Emmerling (4) ont expérimenté les Amino-Acides sur les levures et les bactéries. Ces micro-organismes cultivent parfaitement dans un milieu où l'azote est sous la forme d'Amino-Acide.

Une seconde série d'expérimentations fut faite par de nombreux biologistes pour démontrer que les Amino-Acides naturels sont brûlés par l'organisme et que l'azote qu'ils contiennent est éliminé sous forme d'urée. Dans cette série d'études nous trouvons les noms d'Ignatowski (5) qui expérimenta le Glycocolle, l'Alanine, l'acide glutamique, la Leucine, la phényl-Alanine, la Tyrosine. Cet auteur a démontré que les racémiques laissent passer dans les urines le composant qui n'est pas dans la nature. A cette étude sont également mêlés les noms de Reiss (6), Abderhalden (7), Rohmann (8).

Le mécanisme de la transformation de ces Amino-Acides en oxyacides fut ensuite expliqué.

(1) *C. R.*, juillet 1906.

(2) *Biochem. Zeit.*, 2, 52, 1906.

(3) *Beit- Z. chem. phys. et pathol.*, 1, 542, 1902.

(4) *Ber d. d. bot. Gesellsch.*, 35, 2289, 1902.

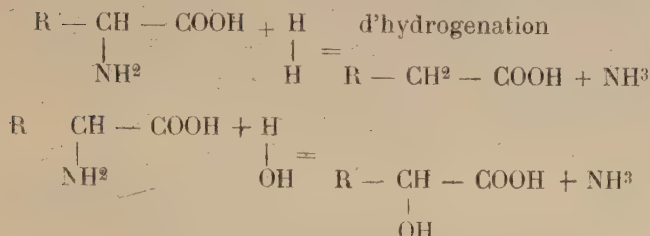
(5) *Zeit. phys. chem.*, 42, 371, 1904.

(6) *Beitrag chem. phys. et path.*, 8, 441, 1906.

(7) *Zeit. phys. chem.*, 51, 323, 1907.

(8) *Arch. f. d. ges. pathol.*, 49, 27, 1886.

On admit d'abord une réaction hydrolytique ou



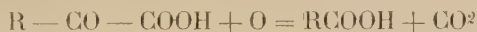
Neuberg et Langstein (1) ont constaté, pour l'explication de cette réaction, la présence d'acide lactique dans l'urine de lapins à qui ils avaient fait ingérer de l'Alanine.

Neubauer (2) prétendait que les Amino-Acides subissaient dans l'organisme les transformations suivantes :

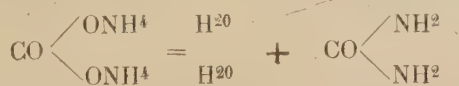
1° Désamination et oxydation, formation d'un acide cétonique.



Départ de CO^2 par oxydation, transformation en acide ayant un atome de C en moins.



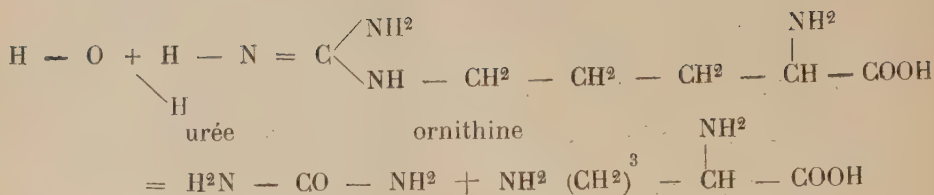
L'acide carbonique, par union avec NH^3 produit le carbonate d'Ammonium qui aboutit finalement à l'urée.



On admet, pour l'urée également, le dédoublement de l'Arginine.

(1) *Verh. d. verl. phys.*, 1903.

(2) *Habitations schrift*, 1908, München.



Maillard pense que la principale formation d'urée vient du processus de déshydratation, c'est-à-dire de la transformation du carbonate d'Ammonium (1). Une partie de l'ammoniaque peut échapper à cette réaction et se combiner aux acides de l'organisme dont la teneur est fonction du défaut d'oxydation de l'organisme. Ces notions ont conduit les physiologistes à mesurer la dyscrasie acide de l'organisme et à dépister les tendances prédiabétiques.

On vit que le rôle des Amino-Acides circulant librement dans le sang sert à la réparation des tissus. Abderhalden (2) trouva dans le sang presque tous les Amino-Acides connus, et on peut ainsi expliquer l'assimilation azotée. Le foie brûle et décompose une certaine quantité de ces acides aminés et ne laisse dans le sang que la quantité nécessaire à la réparation des tissus (3).

On a signalé, dans les urines, la présence normale de Glycocolle et d'autres Amino-Acides. Embden et Reese (4), Abderhalden et Schittenhelm (5), Samue-

(1) *Metaloléine de l'Azote humain. Revue Sc.*, février 1910, p. 261.

(2) *Loc. cit.*, p. 13.

(3) DELAUNAY. *Rôle des Amino-Acides dans l'organisme. Biologie médicale*, février 1911.

(4) *Hofm. Beit.*, 7, 411, 1911.

(5) *Zeit. phys. chem.*, 47, 379, 1906.

ly (1), Wolgemuth et Neubauer (2). Ces expériences ont trait à des urines normales.

Dans les intoxications et dans les cas pathologiques cette amino-acidurie a été signalée par Wolgemuth (3), Ignatowski (4), Abderhalden et Schittenhelm (5). Avec les peptones et albumoses on a trouvé de la Leucine et de la Tyrosine, du Glycocolle et phénylalanine. Dans l'urine des goutteux Ignatowski trouve du Glycocolle, de la Leucine et de l'acide aspartique. On a également trouvé de la Cadavérine et de la putresceine. Enfin la Cystinurie paraît provenir d'une insuffisance hépatique.

Enfin nous avons vu la publication de Monvoisin qui s'est occupé de la question des laits et qui a fait une étude comparative des divers éléments azotés, hydrocarbones ou minéraux, chez les vaches saines et chez les vaches atteintes de mammites tuberculeuses (6). Cet auteur a montré que les affections des mamelles sont causées par des micro-organismes se trouvant au sein de ces glandes. Il s'ensuit que ces microbes forment des sécrétions ou des toxines qui impressionnent les cellules glandulaires, diminuent et anihilent leur activité.

A ce propos, l'azote non protéique a été dosé par lui dans le filtrat du réactif phosphotungstique. Une moyenne de 0,15 à 0,24 de N non protéique a été trouvé par lui dans les laits normaux. Dans les laits patholo-

(1) *Zeit. phys. chem.*, 47, 376, 1906.

(2) *Med. Clin.*, 1906, n° 9.

(3) *Zeit. phys. chem.*, 44, 74, 1904.

(4) *Zeit. phys. chem.*, 42, 388, 1904.

(5) *Zeit. phys. chem.*, 45, 468, 1905.

(6) *Ch. ph.*, 1910, t. II, p. 23.

giques il a trouvé une moyenne de 0,52 de N non protéique, ce qui représente, en calculant en Glycocolle l'azote ainsi dosé, près de trois grammes de cet élément.

Nous avons dans son étude une indication intéressante qui établit que chez les vaches malades ou tuberculeuses l'activité des cellules des glandes mammaires diminuant, l'azote de la Caséine et des matières protéiques diminue tandis que l'azote non protéique augmente. Cet azote non protéique, provenant du sang, n'a pu être utilisé par les cellules glandulaires pour établir avec lui la synthèse de ces protéines. Il y a donc un notable déchet de ces éléments. Les cellules des acini glandulaires n'exercent plus d'action élective sur le sérum sanguin qui les traverse sans transformation, ce qui fait que le liquide issu d'une mamelle malade a une composition presque identique au sérum sanguin.

La présence d'Amino-Acides dans le lait n'est donc pas pour étonner. Ils se trouvent dans le lait non pas comme éléments azotés nutritifs. La présence à côté d'eux de l'azote protéique, bien plus considérable, paraît contredire cette opinion. Mais ils s'y trouvent comme les autres dérivés de métabolisme de l'azote, l'urée, la Créatine, la Créatinine et les dérivés xanthiques cités par Kœnig, si toutefois tous ces dérivés s'y trouvent. Cependant il est à remarquer combien l'azote total de tous ces corps énoncés est faible par rapport à celui des Amino-Acides. Nous avons isolé, en effet, d'une moyenne de 0,25 centigr. d'azote non protéique une moyenne de 20 centigr. d'azote en Amino-Acides. En plus, un dosage de l'Alanine, en vue du

procédé à adopter, nous avait indiqué de légères pertes de l'Amino-Acide dans le filtrat du précipité mercuriel. Les Amino-Acides, avec des traces de peptides, forment donc au moins les $\frac{4}{5}$ de l'azote non protéique. Tous ces corps peuvent en effet se trouver dans le lait comme ils l'étaient dans le sang et comme on les a retrouvés dans les urines normales.

Tous les laits étudiés n'ont pas donné la réaction de la Tyrosine; la Leucine non plus n'a pas été décelée dans tous les laits. Il en est de même pour les acides aspartique et glutamique. Par contre, tous les laits expérimentés, soit dans l'examen des filtrats de réactifs phosphotungstique précipitants, soit dans l'expérimentation où nous avons isolé les produits purs, paraissent contenir du Glycocolle. Certains d'entre eux en contiennent un gramme par litre; la moyenne nous a donné 0,65 centigr. de cet Amino-Acide par litre.

La Leucine, la Tyrosine, les acides aspartique et glutamique entrent dans la proportion de 25 % à eux quatre du complexe Amino-Acide isolé de 20 litres de lait. On sait qu'ils font partie de la molécule de la Caséine et que Hlasiwetz et Habermann (1) ne retirèrent que ces quatre Amino-Acides de la Caséine soumise à l'action du chlorure d'étain et de l'acide chlorhydrique. Il n'est pas étonnant qu'ils soient unis tous les quatre à côté de la protéine dont ils ont pu servir à édifier la synthèse et dont ils constituent des déchets.

Le Glycocolle, dont les moyennes sont très élevées dans le lait comparativement à ses homologues supé-

(1) Loc. cit., p. 84.

rieurs, ne fait pas partie de la molécule de la Caséine. Il fait partie de la molécule de la lactaglobuline dont on ne connaît pas la teneur en cet Amino-Acide. Si cette lactaglobuline présente les mêmes caractères que la sérumglobuline, dans laquelle Abderhalden a trouvé 3,50 de Glycocolle, on voit combien sa teneur dans le lait paraît élevée vis à vis de la protéine dont il est un constituant. Cette protéine donne un poids de 2 à 3 gr. par litre de lait.

(Abderhalden et W. Woltz (2) ont trouvé du Glycocolle dans les enveloppes des globules de lait séparées par un procédé spécial.).

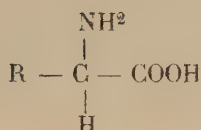
Mais d'autre part on sait que ce Glycocolle se combine dans l'organisme du bœuf avec l'acide benzoïque sous la forme d'amide benzoïque qu'on retrouve en assez grande quantité dans l'urine de la vache.

Dans l'expérience classique provoquée par l'intoxication benzoïque on a constaté que les quantités de Glycocolle mises en œuvre par l'organisme pour se combiner avec l'acide benzoïque par un phénomène diastasique de déshydratation selon l'équation :



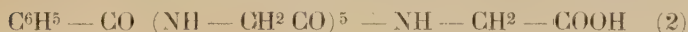
étaient bien supérieures à celles que peuvent apporter les matières protéiques alimentaires. On admet donc que l'organisme est capable de transformer les acides aminés en homologues inférieurs et cela d'autant mieux que le Glycocolle est le premier Amino-Acide dans la série et que tous les Amino-Acides sont des Glycocolles substitués.

(1) *Zeit. phys. chem.*, 1909, 13.



où R peut revêtir la forme CH^3 qui forme l'Alanine et d'autres formes hydro-carbonées de plus en plus denses.

Cette synthèse naturelle a permis à la chimie de s'enrichir de l'acide hippurique synthétique et a, bien avant la synthèse des polypeptides de Fischer, donné à Curtius l'occasion de reconnaître dans cette préparation synthétique, en même temps que l'amide benzoïque du Glycocolle, l'amide benzoïque de la Glycyl-Glycine et l'Amide benzoïque d'une hexapeptide formés concurremment avec l'acide hippurique.



Ces corps qui étaient des polypeptides substitués ne purent être d'aucune utilité ni à Curtius, ni à Fischer (1) pour la libération des peptides, car traités par l'hydrolyse le corps au lieu de se transformer en peptide se dédoublait en Glycocolle et en acide benzoïque (1).

Il n'est donc pas téméraire de supposer que le Glycocolle du lait soit la résultante de la transformation d'autres Amino-Acides qui circulent dans le sang. Il a été trouvé par la méthode de Fischer-Bergell dans le sang de bœuf sous la forme de B naphthalène sulfo-Glycocolle, mais en quantités relativement minimes.

(1) FISCHER. *Ber. d. dact., Ann. chem.*

Trouvé dans le sang de l'animal à l'état libre et dans l'urine à l'état d'amide benzoïque on ne saurait s'étonner de le trouver dans le lait, sinon à l'état de liberté chimique du moins à l'état d'une combinaison que les sels mercuriels défont en milieu alcalin.

Cette lacune que nous n'avons pas la prétention de combler, c'est-à-dire montrer sous quelle forme exacte se trouvent les Amino-Acides du lait, ou expliquer l'anomalie qui fait que le Formaldéhyde n'a pas avec eux sa réaction habituelle, alors que leur étude générale dans le lait a donné de bons résultats, pourrait constituer un sujet d'études intéressant. De même, il ne serait pas superflu de tenter une étude générale des autres dérivés azotés non protéiques du lait de vache.

De mieux en mieux, on définirait ainsi la valeur respective de l'azote pour tous ces corps azotés dans ce liquide et on apporterait des précisions dans l'établissement des coefficients à soustraire de l'azote des protéines.

CONCLUSIONS

I. — Il règne une incertitude sur les Amino-Acides du lait de vache. La Leucine est signalée sans méthode de dosage. L'azote non protéique du lait d'après les auteurs étudiés peut être constitué par un ensemble de corps azotés tels que l'urée, la Créatine, la Créatinine, la Sarcine, l'Hypoxanthine, les Amino-Acides, des corps sulfo-azotés comme les senevols et des dérivés ammoniacaux. C'est de cet ensemble de corps azotés qu'on s'est proposé d'isoler les Amino-Acides.

II. — Dans le but de choisir un réactif permettant d'isoler sans altération les protéines et d'avoir une portion soluble accusant autant que faire se peut un maximum en azote total d'où on essaiera d'isoler les Amino-Acides, on a fait une étude méthodique de quelques réactifs précipitants les matières protéiques et de quelques méthodes.

III. — Il résulte de l'étude de ces réactifs :

a) Que les réactifs métalliques précipitent bien les matières protéiques du lait de vache lorsqu'il existe en eux un mélange optimal de sel et d'acide.

b) Les filtrats de leur précipité accusent un azote limité; une certaine quantité d'azote est retenu par un phénomène de teinture sur le précipité protéines beurre.

c) La moyenne en valeur azotée de leurs filtrats varie de 0,04 à 0,25 centigrammes par litre. Arrivent par ordre pour la valeur azotée de leur filtrat : l'alcool acétique, les réactifs phosphotungstique, de Denigès, de Brucke, de Mayer, de Tanret, le réactif à l'acide trichloracétique, le réactif d'Almen, le réactif silicotungstique.

d) Les filtrats de leur précipité, neutralisés par le carbonate de sodium et traités par l'acétate de mercure en milieu alcalin, fournissent quelques-uns des précipités d'autant plus abondants qu'il y a davantage d'azote total. Ce précipité lavé, mis en suspension dans de l'eau distillée et traité par H_2S au bain-marie nous a permis, dans le rendu obtenu de l'évaporation du liquide, d'y reconnaître des cristaux d'Amino-Acides tels que le Glycéocolle,

la Leucine et la Tyrosine, et d'autres Amino-Acides à identifier. Le Glycocolle a été caractérisé dans tous les laits, la Tyrosine et la Leucine dans quelques laits seulement.

IV. — L'étude de l'action de l'Acide sulfurique à 5 % agissant à froid sur le lait nous a permis de reconnaître le rôle hydrolysant de cet acide sur les matières protéiques du lait. La valeur en azote soluble non protéique par litre, après ce traitement, peut aller jusqu'à 0,35 centigrammes. Cette valeur diminue si on place le milieu de la réaction dans un mélange réfrigérant, et reste très proche de la valeur en azote total du filtrat de l'alcool acétique. Cette méthode ne paraît pas s'imposer pour la recherche des Amino-Acides du lait, car l'introduction d'un métal dans le milieu pour précipiter les protéines provoque des pertes en Amino-Acides. Ce procédé nous a donné 0,71 de produit cristallisé.

V. — La méthode au réactif phosphotungstique a les mêmes défauts, elle nous a donné 0,552 de produit cristallisé.

VI. — L'action du Formaldéhyde sur le lait a été étudiée. Il résulte de cette étude que le Formol échoue pour le dosage des Amino-Acides. L'action de ce réactif paraît s'effectuer sur les matières protéiques et des quelques expériences effectuées, la méthode au Formol pour le dosage des protéines ne paraît pas toujours avoir un degré suffisant d'exactitude.

VII. — Le filtrat de l'alcool acétique qui accuse une valeur de N non protéique, moyenne de 0,25 centigrammes, a servi de base pour l'étude d'un procédé de dosage et d'identification des Amino-Acides du lait. Ce réactif avait l'avantage de produire un filtrat dont l'azote total non protéique était bien supérieur à celui des autres réactifs. Avec lui les protéines du lait n'étaient pas altérées. Ses trois constituants, eau, alcool et acide acétique sont des corps qu'on évapore facilement dans le vide. Le résidu de l'évaporation dans le vide, constitué par l'azote non protéique et les matières hydrocarbonées du lait, traité par l'eau distillée, et par le procédé de Johannes Korb et Carl Neuberg, c'est-à-dire par l'acétate de mercure en milieu alcalin, donne un abondant précipité, qui lavé avec alcool à 80 mis en suspension dans de l'eau distillée et traité par H_2S donne un résidu cristallisé par évaporation.

VIII. — Une première série d'expériences effectuée sur sept

litres de lait nous a donné une moyenne de 1.047 de produit cristallisé par litre. Seul le Glycocolle, avec ses différentes réactions a été caractérisé. Les dérivés cuivrique, zincique, pierique, l'Amide benzoïque, le chlorhydrate d'éther, à l'analyse, ont donné des chiffres voisins des chiffres théoriques. La composition centésimale et le poids moléculaire effectués également nous ont également confirmé dans cette précision.

IX. — Une seconde série d'expériences effectuée sur 20 litres de lait nous a donné par la même méthode adaptée au lait — en dix opérations successives — un résidu cristallisé de 20,020 gr. représentant une moyenne de 1,01 gr. par litre de lait. Nous avons de ce résidu, constitué cette fois par un complexe d'Amino-Acides isolé du Glycocolle, de la Leucine, de la Tyrosine, de l'acide aspartique et glutamique. Les poids moléculaires et les combustions avec les réactions principales de ces Amino-Acides ont été effectués. Le dosage par pesée de ces différents corps azotés a donné :

Pour cent du complexe.		Pour cent de lait.
Glycocolle....	65,23 %	0,0652
Tyrosine.....	9	0,009
Leucine.....	9,18	0,0092
Acide aspartique....	1,98	0,002
— glutamique....	5,37	0,0054

X. — La méthode que l'on a préconisé pour l'isolement des Amino-Acides du lait a été de nouveau effectuée spécialement dans le but de savoir si les Amino-Acides obtenus ne provenaient pas en totalité ou en partie d'un polypeptide hydrolysé. Le résultat de l'opération, effectuée après neutralisation préalable, a donné 0,914 de produit cristallisé, donc 0,551 de Glycocolle déterminé par cryoscopie.

SECONDE THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Physique : Pression osmotique.

Cryoscopie. Ébullioscopie.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 24 Décembre 1920.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. MOLLIARD.

VU et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

APPELL.

Imprimerie de " *L'EXPANSION SCIENTIFIQUE FRANÇAISE* "

7, rue de Valois, Paris.
